

犬腫瘍における L-type amino acid
transporter-1(LAT1)に関する研究
—LAT1 の診断・治療ターゲット分子として
の有用性—

福本 真也

犬腫瘍における
L-type amino acid transporter-1(LAT1)
に関する研究
—LAT1 の診断・治療ターゲット分子としての
有用性—

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

福本真也

分子診断治療学

指導教員 教授 打出 毅

2013 年度

目次	ページ
目次	1
緒論	2-4
第Ⅰ章 犬正常組織における LAT1 の発現	5-16
1. 序文	5
2. 材料と方法	5-9
3. 結果	10-13
4. 考察	14-15
5. 小括	15-16
第Ⅱ章 犬腫瘍組織における LAT1 の発現	17-45
1. 序文	17
2. 材料と方法	17-19
3. 結果	19-42
4. 考察	43-44
5. 小括	44-45
第Ⅲ章 LAT1 に関する機能実験および臨床応用への基礎的研究	46-63
1. 序文	46
2. 材料と方法	46-51
3. 結果	51-60
4. 考察	61-63
5. 小括	63
総括	64-65
謝辞	66
引用文献	67-79

緒論

犬は人類の歴史上、最も古くから人間と深い関係を築いてきた動物の一つである。過去においては牧羊犬や狩猟犬などの労働犬として人間社会への関わりが大きかったが、現在では愛玩用の伴侶動物として確固たる地位が確立されている。犬が伴侶動物として人々の生活に密着するにつれて、その健康管理や病気の治療に関する獣医療に大きな関心が集まっている。診断技術の向上、新薬の登場、伝染病の予防策の確立といった近年の獣医療の進歩は、犬の生活の質の向上や寿命の延長に貢献している。しかしながら、犬の寿命の延長は犬の高齢化を招き、人と同様に高齢で発生の多い腫瘍性疾患の罹患率を増加させる結果ともなっている。現在、悪性腫瘍は犬の死亡原因の第一位を占め、10 歳以上の高齢犬では悪性腫瘍による死亡率が約 45%におよぶ[11]。厚生労働省の調査に基づく犬の飼育登録頭数（平成 21 年度末）は 688 万頭でその登録数は年々増加していることから悪性腫瘍罹患犬も今後増加することが予想され、犬の悪性腫瘍に対する獣医療が持つ社会的役割はより大きくなると考えられる。

犬の悪性腫瘍としては、これまでにリンパ腫、肥満細胞腫、線維肉腫、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、骨肉腫、扁平上皮癌、血管肉腫などが報告されている[2, 6, 19, 20, 28, 59, 72, 80]。いずれの悪性腫瘍においても早期診断、早期治療が予後の改善につながると考えられている[5, 72]。人医療では悪性腫瘍の早期診断や再発予測の為に、様々な腫瘍マーカーが検討され、前立腺癌の前立腺特異抗原、肝細胞癌の α -fetoprotein、膀胱癌の尿 basic fetoprotein、乳癌の癌胎児性抗原や乳房腫瘍関連抗原 225、肺癌のサイトケラチン 19 フラグメントなどが臨床応用されている[8, 16, 30, 37, 45, 52]。一方、獣医療においては有用とされる腫瘍マーカーの報告は限られており[56, 88]、腫瘍の早期診断を困難なものとしている。したがって、犬の悪性腫瘍の多くは診断時において既にリンパ節、肝臓、肺などへ転移を伴っていることが多い[1, 5, 79]。遠隔転移を伴っている進行症例の治療法として、外科的摘出や放射線治療といった局所療法に加え、

化学療法などの全身療法が今後も重要な位置を占めるものと考えられる。獣医学領域ではこれまでに cyclophosphamide、vincristine、vinblastine、doxorubicin、carboplatin などの薬剤が主に使用され、一部の腫瘍では治療成績の向上につながっている[9, 18, 53, 64, 86]。しかしながら、大多数の腫瘍では有効な化学療法薬を見出すことができていないのが現状である。近年、医学領域では腫瘍に特異的に発現している分子をターゲットとした分子標的薬が開発され、獣医学領域でもある種の腫瘍に対し有効性が確認されている[42, 80]。分子標的薬は、腫瘍細胞にのみに特異的に発現する分子をターゲットとするため、従来の殺細胞性の化学療法薬にくらべ副作用が少ないことが特徴としてあげられる。

分子標的薬のターゲット分子として、これまでは主にチロシンキナーゼなどの細胞内情報伝達経路に関連する分子が注目されてきた。現在までに腫瘍化に関連する分子として様々なものが報告され、しかも腫瘍ごとに関連分子に大きな差がみられることから[42, 80]、分子標的薬の特徴でもあるターゲット分子に対する高い特異性は、逆に有効性を示す腫瘍の幅を狭める結果ともなっている[42, 80]。このような状況の中、様々な腫瘍で共通し発現がみられる分子に注目が集まっており、このような分子を治療ターゲットとすることで、広範囲の腫瘍に有効性を示す新規の薬剤開発が検討されつつある。

L-アミノ酸トランスポーター 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) は、Na 非依存性の 12 回膜貫通型のアミノ酸トランスポーターであり、胎児や腫瘍組織で発現が確認される腫瘍胎児性蛋白の 1 つである[35, 39, 49, 57, 62, 70, 75, 92]。人の乳癌、大腸腺癌、非小細胞肺癌、卵巣腫瘍、胃癌、膵臓癌、前立腺癌、扁平上皮癌など、広範囲に渡る腫瘍で発現が確認されている[35, 39, 49, 57, 62, 70, 75, 92]。LAT1 の機能はバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、メチオニン、ヒスチジンなどのアミノ酸を細胞外から細胞内へ輸送するもので、胎児や腫瘍組織など増殖活性の盛んな組織で増加するアミノ酸要求量を補う役目を果たし

ていると考えられている[29, 87]。医学領域ではこの LAT1 の発現パターン（腫瘍での特異的発現）や役割（腫瘍細胞の増殖や生存に必須なアミノ酸の取込）に注目し、LAT1 を腫瘍の診断マーカーや治療ターゲット分子として応用する試みがなされている[17, 27, 29, 74]。LAT1 のアミノ酸トランスポーターとしての機能を特異的に阻害する分子標的薬の開発が実現すれば、副作用が少なく、腫瘍細胞のみを特異的に“兵糧攻め”にする全く新しい概念に基づく腫瘍治療薬となる。

以上のように、獣医学領域では腫瘍性疾患の増加に伴い腫瘍の治療法に関心が集まるとともに、副作用の少ない有効な治療法が望まれるようになり、医学領域で用いられている分子標的薬も獣医学領域へ導入が急速に進みつつある。医学領域で進められている LAT1 に着目した新規治療薬の開発は獣医学領域においても期待が大きいですが、残念なことに獣医学領域では LAT1 の研究はほとんどなされておらず、LAT1 阻害薬の臨床応用の基礎となる動物腫瘍における LAT1 の発現や機能についての情報は全く存在しない。そこで本研究では、まず、第 1 章において犬の正常組織における LAT1 とそれに関連する分子の発現を明らかにした。第 2 章では犬の腫瘍組織における LAT1 の発現解析を行い第 1 章の正常組織の結果と対比させることで、犬腫瘍における LAT1 の発現とその特性を明らかにした。最後に第 3 章では LAT1 をターゲットとした治療法の有用性について実際 LAT1 阻害剤を用い治療効果を検討した。

第 I 章 犬正常組織における LAT1 の発現

1. 序文

L-アミノ酸トランスポーターとしては LAT1、LAT2 の 2 つのサブタイプの存在が確認されており、これらのトランスポーターは 4F2 と共役することで機能し様々な種類のアミノ酸の取り込みに関与する[36, 73, 87] (図 1)。4F2 は、様々なアミノ酸トランスポーターと共役しそれぞれのアミノ酸トランスポーターが機能するために必要な 1 回膜貫通型の膜蛋白質であると考えられている[36, 73, 87]。LAT1 は、成人期の正常組織では、脳、精巣および胎盤とその発現分布は非常に限られているが、胎児期の臓器や腫瘍で広範囲な発現分布が確認されている[35, 39, 49, 57, 62, 70, 75, 92]。一方、LAT2 は腎臓、胎盤、脳、肝臓、脾臓、骨格筋、心臓、小腸および肺と様々な正常臓器においてその発現が認められている[14]。LAT2 の基質との親和性は、LAT1 に比べ低いことから、LAT2 は活発な細胞増殖を必要としない正常組織の細胞で中性アミノ酸の輸送を担っていると考えられている[14, 92]。

現在、医学領域では LAT1 が腫瘍組織で選択的に高発現しているという事実を踏まえ、腫瘍治療の新たなターゲット分子として注目を集めているが、獣医学領域における LAT1 に関する報告は存在しない。LAT1 が人の腫瘍と同様に犬の腫瘍においても治療ターゲット分子として有望であるかを検討するために、第 1 章では、犬の様々な正常組織における LAT1、LAT2 および 4F2 の発現を解析し、腫瘍組織における検討 (第 2 章) と比較するための基礎データとした。

2. 材料と方法

1) 供試犬および材料

酪農学園大学および北里大学で飼育され、臨床的に健康と判断されたイヌの組織を正常組織として用いた (雄 4 頭、雌 6 頭)。これらのサンプルは酪農学園大学および北里大学の実験動物委員会の審査および承認を得たのちに採取された。精巣 (n=4)、

脳 (n=6)、肺 (n=6)、心臓 (n=6)、肝臓 (n=6)、脾臓 (n=6)、小腸 (n=6)、大腸 (n=6)、前立腺 (n=4)、副腎 (n=6)、腎臓 (n=6)、卵巣 (n=4)、子宮 (n=4) および乳腺 (n=6) から一部の組織を採材した。採材した組織は RNA を抽出するために、4℃で RNAlater (Applied Biosystems) に一晩浸漬した後、RNAlater 除去し-80℃で保存した。また蛋白質解析のための組織は、採材した後すぐに - 80℃で保存した。

2) 株化細胞および継代

過去の報告を基に、LAT1、LAT2 および 4F2 の発現が確認されている陽性対照細胞としてヒト乳癌由来株化細胞 MCF-7 を選択し、American Type Culture Collection より購入し使用した[75, 76, 84]。株化細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Life Technologies) に 2 mM L-glutamine、10% 非働化ウシ胎児血清、50 IU/mL ペニシリンおよび 50 µg/mL ストレプトマイシンを添加し 5% CO₂、37℃で培養した。継代は、顕微鏡による観察下において培養細胞が 10cm シャーレで 70~80%コンフルエントに達した時に行った。シャーレの培地を除去し、1ml の 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO) で洗浄し、0.25% Trypsin-EDTA を除去後、再度 0.25%Trypsin-EDTA を 1ml 添加し、37℃、5% CO₂条件下で約 5 分間インキュベートした。細胞がシャーレ底面から剥離されているのを顕微鏡下で確認し、9ml の培養液を添加しピペットでよく混和することで細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を 10ml の培養液を加えたシャーレに 1.0×10^6 個細胞を加え、37℃、5% CO₂条件下で培養し、継代培養を繰り返し行った。

3) 遺伝子発現

[1] total RNA (tRNA) の抽出

RNeasy Mini kit (QIAGEN) と RNase free DNase kit (QIAGEN) の取扱説明書に基づいた手法で凍結組織より tRNA を抽出した。tRNA は cDNA 合成まで、-80℃で凍結保存した。

[2] cDNA 合成

tRNA 溶液の吸光度を吸光度計 (biospecnano、SHIMADZ) により測定し、含有 tRNA 濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を計算した。得られた濃度を基に $1\mu\text{g}$ の total RNA 量を含む溶液を採り、それに超純水 (MilliQ) を加えて総量が $12\mu\text{l}$ となるようにした。これに $5\times$ Reaction Buffer (Toyobo) $4\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP (Takara) $2\mu\text{l}$ 、OligodT (Toyobo) $1\mu\text{l}$ 、ReverTra Ace (Toyobo) $1\mu\text{l}$ を加え $20\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラーで 42°C 60 分間、 90°C 5 分間処理し cDNA を合成した。cDNA は PCR 反応まで -80°C で凍結保存した。

[3] 定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR により組織における目的遺伝子の mRNA 発現量を定量した。標的遺伝子名、使用プライマーの塩基配列、PCR 反応条件および塩基配列情報を得たデータベースの Accession number を表 1 に示した。qRT-PCR は Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen) および iQ5/MyiQ Single-Color (Bio-Rad Laboratories) を使用し、説明書に基づき実施した。目的遺伝子の増幅産物は pSTBlue-1 ベクター (Novagen) でサブクローニングし、塩基配列解析で目的遺伝子の挿入を確認した後、検量線作成のためのコントロールテンプレートとして用いた。検量線は、 10^8 、 10^6 、 10^4 および 10^2 コピーの コントロールテンプレートを増幅し作成した。いずれの遺伝子についてもメルトカーブより単一の増幅が得られていることを確認した。組織で発現する mRNA のコピー数を検量線から算出し、ハウスキーピング遺伝子であるリボソームタンパク質 19 (RP19) 遺伝子を用い、以下の式に従い組織における目的 mRNA の相対発現量を求めた。解析は各組織について 3 回行い、値は $\text{mean}\pm\text{SD}$ で表した。また、遺伝子定量実験は酪農学園大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った。

$$[\text{相対発現量}] = [\text{目的遺伝子発現コピー数}] \div [\text{RP19 遺伝子発現コピー数}]$$

4) 蛋白発現解析 (ウェスタンブロット)

細胞膜分画蛋白質を過去の報告に基づいて調整した。細胞ペレットに細胞溶解緩衝液 (250 mM sucrose, 2 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 20 mM Hepes, pH=7.4) 1ml、プロテアーゼ阻害カクテル (Nakalai) 20μl 加え、ダウンス型ホモジナイザーで 20 回破碎した。ホモジネートを 31,000g、4°C で 1 時間遠心し、得られた細胞膜分画蛋白を上記のバッファーで再浮遊した。蛋白量はローリー法 (Modified Lowery Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) により測定し、1 レーンあたり 20μg の膜蛋白質を 10%SDS-PAGE にて泳動した。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、1 次抗体および 2 次抗体を表 2 に示す希釈率を用いて反応させた。泳動像は ECL2 (Amersham) にて可視化した。

5) 統計解析

各正常組織間の *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現比較はマン・ホイットニーU 検定にて解析した。危険率 (*P*) が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意差ありと判定した。また、*LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量は有効数字を 2 ケタとして表記した。データ分析はエクセル統計 2010 (SSRI) で行なった。

表 1. 使用したプライマーおよび PCR の条件

Gene	Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplicons (bp)	Conditions	Accession No.
<i>LAT1</i>	F: CTGGATCGAGCTGCTCATCATC	273	95°C for 30sec, 63°C for 30sec, 72°C for 30sec	XM_845083 (dog)
	R: ACATCACCTTCCCGATCTGG			AF104032 (human)
<i>LAT2</i>	F: TTCCTGACTTCCTTCGTGCC	233	95°C for 30sec, 61°C for 30sec, 72°C for 30sec	XM_540898 (dog)
	R: CGTGGGTCTTCATTCTGGCT			AF171669 (human)
<i>4F2</i>	F: GGAGTTTTTGCTGCAAGCTG	239	95°C for 30sec, 60°C for 30sec, 72°C for 30sec	XM_540898 (dog)
	R: TGCTCCCCAGTAGAACCAG			AB018010 (human)
<i>RP19</i>	F: CCTTCCTCAAAAAGTCTGCG	95	95°C for 30sec, 60°C for 30sec, 72°C for 30sec	XM_538673 (dog)
	R: GTTCTCATCGTAGGGAGC			NM_001022 (human)

F, forward; R, reverse; bp, base pair

表 2. 使用した抗体と希釈条件

Protein	Antibody	Protein size (KDa)	Dilution rate
LAT1	Primary antibody: rabbit antihuman LAT1 polyclonal IgG	39	Primary; 1:1,000
	Cell Signaling Technology		Secondary; 1:30,000
LAT2	Primary antibody: rabbit antihuman LAT2 polyclonal IgG	58	Primary; 1:500
	Abcam		Secondary; 1:20,000
4F2	Primary antibody: rabbit antihuman 4F2 polyclonal IgG	98	Primary; 1:1,500
	Abcam		Secondary; 1:20,000
IgG	Secondary antibody: goat antirabbit IgG HPE IgG	-	-
	Cell Signaling Technology	-	-

KDa, kilodalton; HPE, Horseradish-peroxidase-labeled

3. 結果

1) 正常組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現

LAT1 mRNA の発現量は精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺でそれぞれ 0.84 ± 0.21 、 0.79 ± 0.18 、 0.064 ± 0.022 、 0.056 ± 0.024 、 0.031 ± 0.035 、 0.022 ± 0.018 、 0.017 ± 0.015 、 0.0093 ± 0.0081 、 0.0062 ± 0.0026 、 0.012 ± 0.0082 、 0.037 ± 0.024 、 0.0066 ± 0.0023 、 0.0021 ± 0.0023 および 0.026 ± 0.038 であり、精巣および脳での *LAT1* mRNA の発現量はその他の臓器と比較して約 30 倍 ($P < 0.05$) 高いことが明らかになった (図 2)。

LAT2 mRNA の発現量は、精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺でそれぞれ、 0.25 ± 0.19 、 0.72 ± 0.19 、 0.11 ± 0.10 、 0.12 ± 0.032 、 0.32 ± 0.12 、 0.16 ± 0.16 、 0.65 ± 0.24 、 0.74 ± 0.26 、 0.12 ± 0.074 、 0.18 ± 0.069 、 0.83 ± 0.17 、 0.15 ± 0.11 、 0.079 ± 0.023 および 0.057 ± 0.039 であり、脳、小腸、大腸、腎臓で高く、子宮および乳腺では低い傾向にあった (図 2)。

4F2 mRNA の発現量は、精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺でそれぞれ、 0.70 ± 0.30 、 0.78 ± 0.25 、 0.36 ± 0.29 、 0.28 ± 0.29 、 0.36 ± 0.19 、 0.20 ± 0.21 、 0.70 ± 0.25 、 0.79 ± 0.22 、 0.15 ± 0.065 、 0.18 ± 0.069 、 0.92 ± 0.14 、 0.40 ± 0.26 、 0.43 ± 0.19 、および 0.30 ± 0.29 であり、精巣、脳、小腸、大腸、腎臓で発現量が高い傾向にあった (図 2)。

2) 正常組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* 蛋白の発現

図 3 に示したように *LAT1* 蛋白の発現は脳のみで観察されたが、*LAT2* 蛋白の発現は精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣と広い範囲に発現することが確認された。また、*4F2* 蛋白の発現は、精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺で発現が認められた。

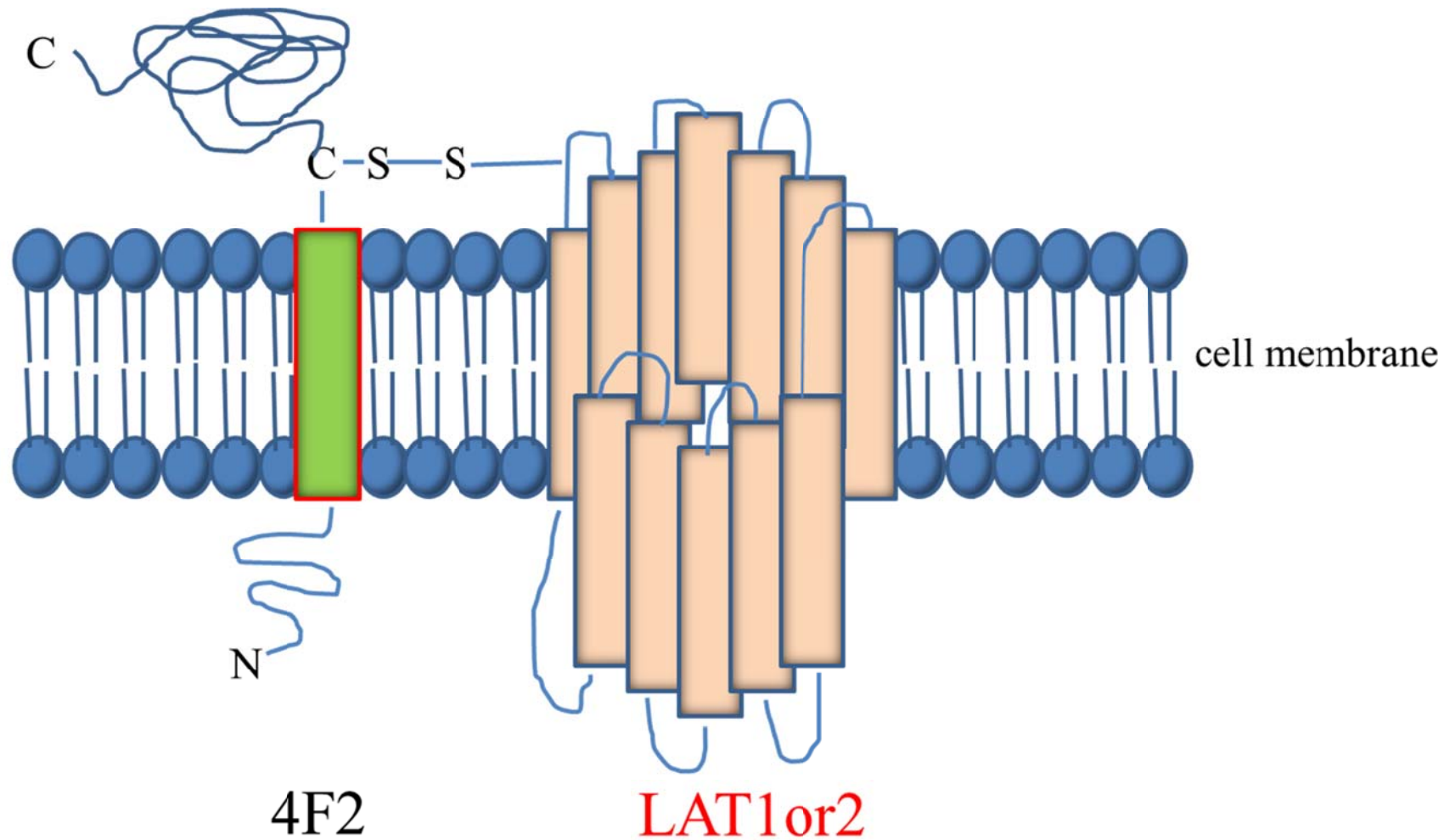


図 1. LAT1 および LAT2 と 4F2 の関係

LAT1 および LAT2 はそれぞれ 12 回膜貫通型のアミノ酸トランスポーターで、4F2 と共役することで機能すると考えられている[36, 73, 87]。

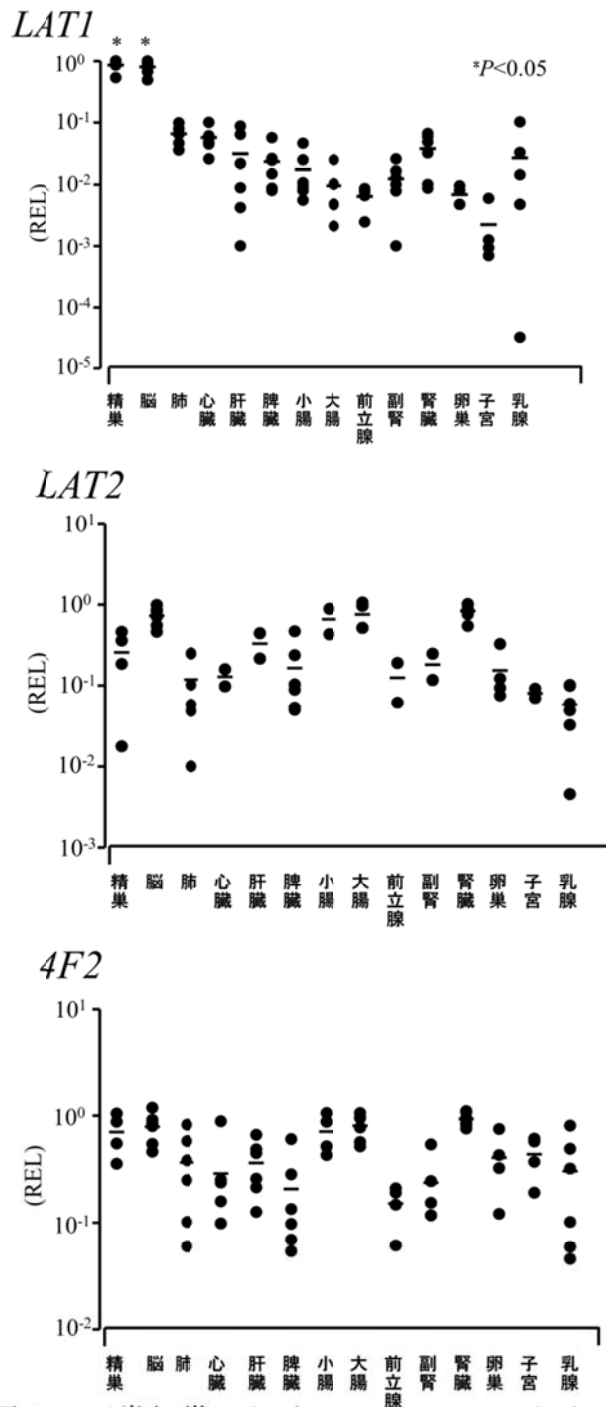


図 2. 正常組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現

犬正常組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。精巣および脳での *LAT1* mRNA の発現量はその他の臓器と比較して約 30 倍 ($P < 0.05$) 上昇にしていた。*LAT2* mRNA の発現量は、脳、小腸、大腸、腎臓で高く、子宮および乳腺で低い傾向にあった。*4F2* mRNA の発現量は精巣、脳、小腸、大腸、腎臓で発現が高い傾向にあった。

● : それぞれの組織における REL, — : REL の平均値

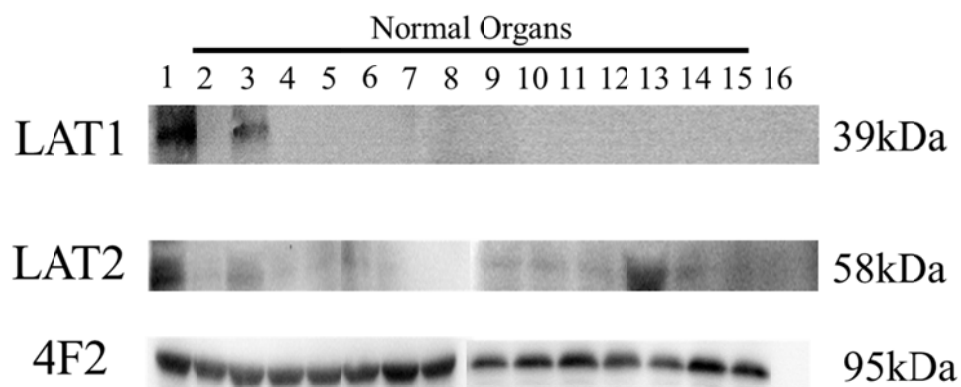


図 3. 正常組織における LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白質の発現

MCF-7 は LAT1、LAT2 および 4F2 のポジティブコントロールとして示した。LAT1 の発現は脳でのみ認められた。LAT2 の発現は、精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓および卵巣で認められた。4F2 の発現は、精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮、乳腺で認められた。

Lane 1: MCF-7, Lane 2: 精巣, Lane 3: 脳, Lane 4: 肺, Lane 5: 心臓, Lane 6: 肝臓, Lane 7: 脾臓, Lane 8: 小腸, Lane 9: 大腸, Lane 10: 前立腺, Lane 11: 副腎, Lane 12: 腎臓, Lane 13: 卵巣, Lane 14: 子宮, Lane 15: 乳腺, Lane 16: mock control

4. 考察

人の胎児および成人における全身の正常な臓器における LAT1 の発現に関する報告は、Nakada らによって 2013 年になされた[55]。彼らは、胎児期の心筋、肝細胞、胸腺細胞および神経外胚葉細胞では LAT1 発現を確認できるが、成人のそれらの臓器で発現を確認することができなかったことから、LAT1 は癌胎児蛋白であると報告した[55]。犬の正常組織を用いた本検討において LAT1 の発現は脳でのみで確認され、正常組織における LAT1 の限局的な発現性は犬でも人と同様であることがわかった。胎児期の犬における LAT1 の発現に関する検討は本研究では実施していないが、LAT1 は人と同様犬においても癌胎児蛋白であると想定される。本研究で犬脳組織における LAT1 の発現局在性は確認していないが、マウスではすでに検討され、4F2 とともに血液・脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞の血管腔側および脳神経細胞側の双方の細胞膜に発現が確認されている[34]。この脳組織における発現局在から、LAT1 はアミノ酸およびアミノ酸類似薬物の脳への移動を調整する血液・脳関門として役割を果たしているものと推測されている。犬の脳においても LAT1 の同様な役割が推察できる。

脳と同様に精巣における LAT1 mRNA の発現量は他の臓器と比べ著しく高値（約 30 倍）を示したが、蛋白質レベルではその発現を確認できなかった。原因として、①蛋白質が mRNA より翻訳される過程の問題、②qRT-PCR とウェスタンブロットの解析感度の差が考えられる。このような遺伝子発現とタンパク質発現との解離について Nakanishi らは興味深い報告をしている。彼らは、肺腺癌と腺腫状過形成の組織において免疫染色とインサイチュハイブリダイゼーション法により LAT1 の発現を比較している。LAT1 蛋白質の発現は肺腺癌で 79.1%、腺腫状過形成組織で 52.2%認められたのに対し、LAT1 mRNA の発現は肺腺癌で 65.2%、腺腫状過形成組織で 65.1%であった。この成績は、本研究結果と同様に、蛋白質レベルと mRNA レベルでの発現解析結果が解離することを示唆しており、LAT1 mRNA からの LAT1 蛋白質への翻訳過程は今後の研究していかなければならない分野であろう[57]。

一方、LAT2 は犬においても人と同様に組織で広範囲な発現パターンを示したことから、LAT2 は正常組織細胞でのアミノ酸取り込みに重要な役割を果たしていると考えられる[14]。LAT2 mRNA の発現量が小腸、大腸、腎臓で特に高値を示したが、これは Rossier らの報告[69]と一致し LAT2 が腸粘膜や尿細管におけるアミノ酸の吸収や再

吸収に関与するためにこれら臓器での発現が高くなっていると推察できる。また、彼らは LAT1 と LAT2 の各種アミノ酸への親和性について、LAT2 は LAT1 と比較して 10 倍以上 L-フェニルアラニンや L-グルタミンへの親和性が高い一方で、ヒスチジンへの親和性は LAT1 の 1/10 であったと報告している[69]。LAT1 と LAT2 はその発現時期や臓器が異なり、かつ各種アミノ酸に対する親和性が異なることは、両アミノ酸のトランスポーターが臓器特異的に不均一に発現することによりそれぞれの臓器で特に要求されるアミノ酸種を供給し易い環境を作るのに役立っているのではないかと考察されている[69]。

4F2 の発現は、今回検索したすべての臓器において発現が確認された。LAT1 mRNA および LAT2 mRNA の発現が高い臓器では 4F2 mRNA の発現も高値を示した。この結果はヒトにおける報告と一致している。4F2 は LAT1 や LAT2 と共役して機能する蛋白質であることが明らかになっており、本研究の結果はこの事実と矛盾しない。子宮や乳腺で LAT1 mRNA や LAT2 mRNA の発現が認められないにもかかわらず、4F2 mRNA の発現が認められたことは興味深い。4F2 と共役する蛋白は LAT1 や LAT2 以外にも x-cysteine/glutamate antiporter[47] など知られているが、これらの蛋白質に関する研究は十分なされておらず子宮における 4F2 の役割に関しては今後の検討が必要と思われる。

5. 小括

本章では、正常犬の各種臓器における LAT1、LAT2 および 4F2 の mRNA、タンパク質の発現を定量的 PCR 法およびウエスタンブロット法で検討した。得られた成績は以下に示すとおりである。

- 1) LAT1 は、正常組織 では脳および精巣に局限して発現していた。
- 2) LAT2 は、多くの正常組織 (精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎および腎臓) で発現が認められた。
- 3) 4F2 は、多くの正常組織 (精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺) で発現が認められた。
- 4) mRNA の発現とタンパク質の発現との間には解離が認められる臓器があった。

以上の結果からヒトでの報告と同様に犬においても、LAT1 は極めて限られた組織

のみで発現しているが、LAT2 や 4F2 は多くの正常組織で発現していることが明らかになった。

第Ⅱ章 犬腫瘍組織における LAT1 の発現

1. 序文

第Ⅰ章の結果から、犬の正常状態では LAT1 蛋白質は人での報告[87]と同様に限られた臓器でのみで発現することが明らかになった。人の正常組織では LAT1 発現分布が精巣、脳および胎盤に限られていたのに対し、腫瘍組織では乳癌、大腸腺癌、非小細胞肺癌、卵巣腫瘍、胃癌、膵臓癌、前立腺癌、扁平上皮癌と広範囲の腫瘍で発現が認められたことから、LAT1 は近年腫瘍の新たな診断マーカーとして注目を集めている[35, 39, 49, 57, 62, 70, 75, 92]。しかしながら、犬の腫瘍における LAT1 に関する報告はなく、獣医領域での LAT1 の診断マーカーとしての有用性は不明である。

Positron emission tomography (PET) は、腫瘍細胞のグルコースの要求量が正常細胞と比較して著しく高いことに注目し、組織でのグルコース集積状況を可視化することで腫瘍を診断する画像解析法である。最も一般的な方法としては、半減期が短い ^{18}F がラベルされたフルオロデオキシグルコース(FDG) を用い Computed Tomography (CT) と組み合わせることで腫瘍の発生部位を同定することが可能である[13, 67, 77]。しかしながら、FDG を用いた PET による腫瘍の診断は、人子宮腫瘍では約 20%偽陽性を示し[46]、前立腺腫瘍では約 70%偽陰性を示す[32]と報告されており、現在は FDG に代わる基質の研究が進んでいる。LAT1 が腫瘍に特異的に発現するアミノ酸トランスポーターであることに着目し、新たな基質としてアミノ酸を用い LAT1 を介したアミノ酸取り込みを検知し、腫瘍の診断率の向上を図る試みがなされている。扁平上皮癌、グリオーマなどで感度、特異度、正診率が FDG と比較して改善されたとの報告もある[40, 60, 95]。また、人の乳癌、膵臓癌、胃癌、非小細胞肺癌では、LAT1 の発現と予後が相関するとも報告されており、LAT1 は予後判定因子の一つとして注目を集めている[21, 26, 35, 93]。

第Ⅱ章では第Ⅰ章で正常組織での LAT1、LAT2 および 4F2 の発現を検索したのに続き、犬の様々な腫瘍においてその発現を検索することで LAT1 の腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

2. 材料と方法

1) 供試犬および採材

2008 年 11 月から 2013 年 8 月に酪農学園大学附属動物病院、北海道大学附属動物病院および近隣の開業動物病院に来院し、外科手術後病理組織診断によって腫瘍と診断された症例を用いた。なお病理組織診断は一人の経験豊富な獣医病理診断医によって実施された。また、これらのサンプルを得るにあたり、酪農学園大学および北海道大学の実験動物委員会の審査および承認を得たのちに採材した。また、飼い主には研究内容の説明をして実験に供することへの了解を得た。採材した組織は tRNA を抽出するために、4℃で RNeasy (Applied Biosystems) に一晩浸漬した後、RNeasy を除去し -80℃で保存した。また、蛋白の解析のための組織は採材後直ちに -80℃に冷却し保存した。

2) 株化細胞および継代

過去の報告を基に、LAT1、LAT2 および 4F2 の発現が確認されている陽性対照細胞としてヒト乳癌由来株化細胞 MCF-7 を用いた[75, 76, 84]。培養法は第 1 章に記載して方法に準じて行った。

3) mRNA 発現の解析

LAT1、LAT2 および 4F2 mRNA 発現の解析は第 1 章に記載した qRT-PCR の方法に準じて行った。

4) 蛋白発現 の解析(ウェスタンブロット)

腫瘍における LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白の発現の解析は第 1 章に記載したウェスタンブロットの方法に準じて行った。

5) 統計解析

腫瘍組織間の LAT1、LAT2 および 4F2 mRNA の発現比較はマン・ホイットニーU 検定にて行った。危険率 (P) が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意差ありと判定した。LAT1、LAT2 および 4F2 mRNA 発現量より ROC 曲線を作製し、Youden index が最も高い検体の発現量をカットオフ値として設定することで、LAT1、LAT2 および 4F2 mRNA 発現量に基づく感度、特異度および正診率を求めた。また、LAT1、LAT2 およ

び *4F2* mRNA 発現量の相関性について、データが正規分布している時はピアソンの順位相関係数、正規分布していない場合はスピアマンの順位相関係数を用いて解析した。*LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量は有効数字を 2 ケタとして表記した。データ分析はエクセル統計 2010 (SSRI) で行なった。

3. 結果

1) 腫瘍の概要

腫瘍の内訳は、乳腺腫瘍 83 症例、悪性黒色腫 25 症例、血管肉腫 15 症例、移行上皮癌 10 症例、肥満細胞腫 7 症例、線維肉腫 6 症例、骨肉腫 5 症例、精巣腫瘍 3 症例、肺腺癌 4 症例、肝細胞癌 5 症例および肛門嚢腺癌 5 症例であった。年齢は平均 9.8 ± 3.0 歳 (中央値:10 歳、範囲:4~17 歳) だった。性別は未避妊雌が 80 症例、避妊雌が 40 症例、未去勢雄が 27 症例、去勢雄が 21 症例だった (表 3)。症例数が十分確保できた乳腺腫瘍および悪性黒色腫に関して、その詳細を表 4-6 に示した。

2) 腫瘍における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* 蛋白の発現

犬の様々な腫瘍組織において、*LAT1*、*LAT2* および *4F2* 蛋白の発現をウェスタンブロット法により検索した。*LAT1* 蛋白の発現は乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌で認められ、*LAT2* 蛋白の発現は線維肉腫で認められた。*4F2* 蛋白の発現は今回検索した全ての組織において発現が確認された (図 4)。

3) 腫瘍における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現

[1] *LAT1* mRNA の発現

腫瘍組織での *LAT1* mRNA の発現量 (0.84 ± 1.1) は正常組織での発現量 (0.12 ± 0.27) と比較して約 6 倍の高値 ($P < 0.01$) を示した (図 5)。正常組織で高値を示した精巣や脳での値を除いて比較を行うと、腫瘍組織での発現量は正常組織の発現量 (0.026 ± 0.027) と比較して約 32 倍高値 ($P < 0.01$) であった。

腫瘍別に比較したところ、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、線維肉腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌での発

現量は、それぞれ 0.70 ± 0.91 、 0.45 ± 0.43 、 2.1 ± 2.3 、 0.97 ± 0.94 、 0.52 ± 0.51 、 0.33 ± 0.34 、 0.84 ± 0.74 、 0.88 ± 0.55 、 0.82 ± 0.52 、 1.2 ± 0.50 および 0.67 ± 0.57 であり、精巣腫瘍を除く全ての腫瘍で正常組織での発現量より有意 ($P < 0.01$) に高値を示した (図 6)。また、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌および精巣腫瘍について、それぞれ正常乳腺、正常皮膚組織、正常脾臓、正常膀胱および正常精巣組織での発現量と比較したところ、乳腺腫瘍で 26 倍、悪性黒色腫で 17 倍、血管肉腫で 79 倍、膀胱移行上皮癌で 26 倍高値を示したが、精巣腫瘍での発現量は正常精巣組織と同程度であった (図 7)。

LAT1 mRNA の発現量に注目し、ROC 曲線から Youden index が最も高い検体の発現量をカットオフ値として設定することで、発現量に基づく腫瘍診断の感度、特異度および正診率を求めた。今回実施した全てのサンプル (精巣、脳を含む) に対し *LAT1* mRNA 発現量 (REL) のカットオフ値を 0.30 に設定すると犬腫瘍における感度、特異度および正診率はそれぞれ 82.1%、86.8%、83.6%であった (表 7)。しかしながら、*LAT1* の発現が正常な脳や精巣で極めて高い値であることから精巣、脳および精巣腫瘍を除きカットオフ値を 0.15 に設定すると感度、特異度および正診率はそれぞれ 85.4%、100%、89.6%と上昇した (表 8)。

症例数が十分確保することが出来た犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫に関して、腫瘍性状と *LAT1* mRNA の発現量を比較検討した。乳腺腫瘍において病理組織診断で良性と診断された群 (0.58 ± 0.44) と悪性と診断された群 (0.48 ± 0.49) に関して、*LAT1* mRNA の発現量を比較したが有意な差は認められなかった (図 8)。脈管浸潤を伴う群を浸潤性群、脈管浸潤を伴わない群を非浸潤性群と分類した場合、浸潤群 (0.58 ± 0.60) は非浸潤群 (0.30 ± 0.30) に比べ有意 ($P < 0.05$) に高値を示した (図 8)。悪性黒色腫において所属リンパ節や肺に転移を伴った群を転移群、転移を伴わない群を非転移群と分類した場合、転移群 (0.56 ± 0.45) は非転移群 (0.22 ± 0.19) に比べ有意 ($P < 0.05$) に高値を示した (図 8)。

乳腺腫瘍における浸潤の有無や悪性黒色腫における転移の有無は予後因子の一つであることから[5, 71]、*LAT1* mRNA 発現量はこれらの腫瘍の予後因子の一つとして評価対象となる可能性が示された。

[2] *LAT2* mRNA の発現

腫瘍組織での *LAT2* mRNA の発現量 (0.090 ± 0.14) は正常組織での発現量 (0.34 ± 0.31) と比較して約 4 分の 1 に低下していた (図 9)。

腫瘍別に比較したところ、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、線維肉腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌での発現量は、それぞれ 0.043 ± 0.076 、 0.10 ± 0.11 、 0.050 ± 0.051 、 0.010 ± 0.0076 、 0.18 ± 0.30 、 0.20 ± 0.32 、 0.076 ± 0.082 、 0.19 ± 0.16 、 0.076 ± 0.032 、 0.080 ± 0.026 および 0.081 ± 0.057 であり、肥満細胞腫、線維肉腫、精巣腫瘍を除く腫瘍で有意 ($P < 0.05$) に低値を示した (図 10)。また、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌および精巣腫瘍について、それぞれ正常乳腺、正常皮膚組織、正常脾臓、正常膀胱および正常精巣組織での発現量と比較したところ、悪性黒色腫で 1/3 倍、血管肉腫で 1/4 倍、膀胱移行上皮癌で 1/8 倍の低値を示したが、乳腺腫瘍および精巣腫瘍での発現量は正常組織と同程度であった (図 11)。

LAT2 mRNA の発現量に注目し、ROC 曲線から Youden index が最も高い検体の発現量をカットオフ値として設定することで、発現量に基づく腫瘍診断の感度、特異度および正診率を求めた。今回実施した全てのサンプルに対し *LAT2* mRNA 発現量 (REL) のカットオフ値を 0.071 に設定すると犬腫瘍における感度、特異度および正診率はそれぞれ 78.5%、81.5%、79.5%であった (表 9)。

症例数が十分確保することが出来た犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫に関して、腫瘍性状と *LAT2* mRNA の発現量を比較検討した。乳腺腫瘍において病理組織診断で良性と診断された群 (0.049 ± 0.096) と悪性と診断された群 (0.037 ± 0.053) に関して、*LAT2* mRNA の発現量を比較したが有意な差は認められなかった (図 12)。脈管浸潤を伴う群を浸潤性群、脈管浸潤を伴わない群を非浸潤性群と分類した場合、浸潤群 (0.038 ± 0.073) と非浸潤群 (0.035 ± 0.025) に *LAT2* mRNA の発現に有意な差は認められなかった (図 12)。悪性黒色腫において所属リンパ節や肺に転移を伴った群を転移群、転移を伴わない群を非転移群と分類した場合、転移群 (0.059 ± 0.034) と非転移群 (0.16 ± 0.14) に有意な差は認められなかった (図 12)。

乳腺腫瘍における浸潤の有無や悪性黒色腫における転移の有無は予後因子の一つであることから、*LAT2* mRNA 発現量はこれらの腫瘍の予後因子との関連性は認めら

れなかった[5, 71]。

[3] 4F2 mRNA の発現

腫瘍組織での 4F2 mRNA の発現量 (1.1 ± 1.1) は正常組織での発現量 (0.48 ± 0.33) と比較して約 2 倍高値 ($P < 0.05$) を示した (図 13)。

腫瘍別に比較したところ、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、線維肉腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門囊腺癌での発現量は、それぞれ 0.90 ± 0.87 、 0.77 ± 0.44 、 2.5 ± 2.3 、 1.3 ± 0.89 、 0.89 ± 0.54 、 0.59 ± 0.48 、 1.0 ± 0.90 、 1.8 ± 0.54 、 1.1 ± 0.45 、 1.4 ± 0.50 および 1.0 ± 0.68 であり、精巣腫瘍を除く全ての腫瘍で正常組織での発現量より有意 ($P < 0.05$) に高値を示した(図 14)。また、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌および精巣腫瘍について、それぞれ正常な乳腺、皮膚組織、脾臓、膀胱および正常精巣組織での発現量とそれぞれ比較したところ、それぞれの正常組織に比べて乳腺腫瘍で 3 倍、悪性黒色腫で 2 倍、血管肉腫で 9 倍、膀胱移行上皮癌で 2 倍の高値を示したが、精巣腫瘍での発現量は正常精巣組織と同程度であった (図 15)。

4F2 mRNA の発現量に注目し、ROC 曲線から Youden index が最も高い検体の発現量をカットオフ値として設定することで、発現量に基づく腫瘍診断の感度、特異度および正診率を求めた。今回実施した全てのサンプルに対し 4F2 mRNA 発現量 (REL) のカットオフ値を 0.71 に設定すると犬腫瘍における感度、特異度および正診率はそれぞれ 69.4%、69.7%、68.8%であった (表 10)。

症例数が十分確保することが出来た犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫に関して、腫瘍性状と 4F2 mRNA の発現量を比較検討した。乳腺腫瘍において病理組織診断で良性と診断された群 (1.0 ± 1.1) と悪性と診断された群 (0.79 ± 0.49) に関して、4F2 mRNA の発現量を比較したが有意な差は認められなかった (図 16)。脈管浸潤を伴う群を浸潤性群、脈管浸潤を伴わない群を非浸潤性群と分類した場合、浸潤群 (0.81 ± 0.42) は非浸潤群 (0.76 ± 0.54) に比べ有意 ($P < 0.05$) に高値を示した (図 16)。悪性黒色腫において所属リンパ節や肺に転移を伴った群を転移群、転移を伴わない群を非転移群と分類した場合、転移群 (0.97 ± 0.51) は非転移群 (0.58 ± 0.25) に比べ有意 ($P < 0.05$) に高値を示した (図 16)。

悪性黒色腫における転移の有無は予後因子の一であることから、*4F2* mRNA 発現量は悪性黒色腫の予後因子の一つとして評価対象となる可能性が示された[5, 71]。

[4] *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA 発現の相関性

LAT1 と *4F2* mRNA、*LAT2* と *4F2* mRNA、*LAT1* と *LAT2* mRNA の発現量の間相関性を検討した[36, 73, 87]。様々な腫瘍組織において *LAT1* と *4F2* mRNA 発現の間に正の相関性が認められた (図 17)。

表 3. 腫瘍罹患犬の概要

腫瘍の種類	症例数
乳腺腫瘍	83
悪性黒色腫	25
血管肉腫	15
移行上皮癌	10
肥満細胞腫	7
線維肉腫	6
骨肉腫	5
精巣腫瘍	3
肺腺癌	4
肝細胞癌	5
肛門嚢腺癌	5
年齢	
平均年齢±SD	9.8±3.0歳
中央値	10歳
範囲	4～17歳
性別	症例数
未避妊雌	80
避妊雌	40
未去勢雄	27
去勢雄	21

表 4. 乳腺腫瘍罹患犬の概要

犬種	症例数
ミニチュア・ダックスフント	20
ビーグル	8
シー・ズー	6
パピヨン	6
ウェルッシュ・コーギー・ペンギローブ	5
マルチーズ	5
チワワ	4
キャバリア・チャールズ・スパニエル	3
シェットランド・シープドッグ	3
ミニチュア・シュナウザー	2
アメリカン・コッカー・スパニエル	2
ウェスト・ハイランド・ホワイト・テリア	2
グレート・ピレニーズ	1
ミニチュア・ブルテリア	1
プードル	1
ペキニーズ	1
ヨークシャー・テリア	1
日本スピッツ	1
アフガン・ハウンド	1
雑種	10
年齢	
平均年齢 $\pm$ SD	10 $\pm$ 2.4歳
中央値	10歳
範囲	4～16歳
性別	症例数
未避妊雌	61
避妊雌	21
雄	1

表 5. 乳腺腫瘍組織の概要

大きさ	検体数
平均値±SD	3.0±2.6cm
中央値	2.0cm
範囲	0.5～11cm
T1	45
T2	21
T3	10
不明	7
病理組織学的分類	検体数
良性腫瘍	42
単純腺腫	3
複合腺腫	22
良性混合腫瘍	17
悪性腫瘍	41
単純腺癌	21
複合腺癌	17
腺癌	1
癌肉腫	1
骨肉腫	1
浸潤性の有無	41
非浸潤性	19
浸潤性有	22

表 6. 悪性黒色腫罹患犬の概要

犬種	症例数
ゴールデン・レトリバー	4
ミニチュア・ダックスフンド	4
アメリカン・コッカー・スパニエル	2
パピヨン	1
シー・ズー	1
シェットランド・シープドッグ	1
フラットコーテッド・レトリバー	1
北海道犬	1
ビーグル	1
チワワ	1
シャパード	1
柴	1
ニューファンドランド	1
雑種	5
年齢	
平均年齢±SD	11±3.2歳
中央値	10歳
範囲	5～16歳
性別	症例数
未避妊雌	4
避妊雌	4
未去勢雄	12
去勢雄	5
腫瘍の大きさ	
平均値±SD	3.5±2.6cm
中央値	2.5cm
範囲	0.5～11cm
T1	5
T2	6
T3	14
遠隔転移の有無	症例数
有り	19
無し	6
原発部位	症例数
口腔内	21
四肢	4

表 7. *LAT1* mRNA 発現量に基づく腫瘍診断

	正常組織	腫瘍組織	計
<i>LAT1</i> : $0.30 \geq$	10	138	148
<i>LAT1</i> : $0.30 <$	66	30	96
計	76	168	244

表 8. *LAT1* mRNA 発現量に基づく腫瘍診断 (脳および精巣を除く)

	正常組織	腫瘍組織	計
<i>LAT1</i> : $0.15 \geq$	0	141	141
<i>LAT1</i> : $0.15 <$	66	24	90
計	66	165	231

表 9. *LAT2* mRNA 発現量に基づく腫瘍診断

	正常組織	腫瘍組織	計
<i>LAT2</i> : $0.071 \geq$	62	44	106
<i>LAT2</i> : $0.071 <$	14	132	146
計	76	168	244

表 10. *4F2* mRNA 発現量に基づく腫瘍診断

	正常組織	腫瘍組織	計
<i>4F2</i> : $0.71 \geq$	23	115	138
<i>4F2</i> : $0.71 <$	53	53	106
計	76	168	244

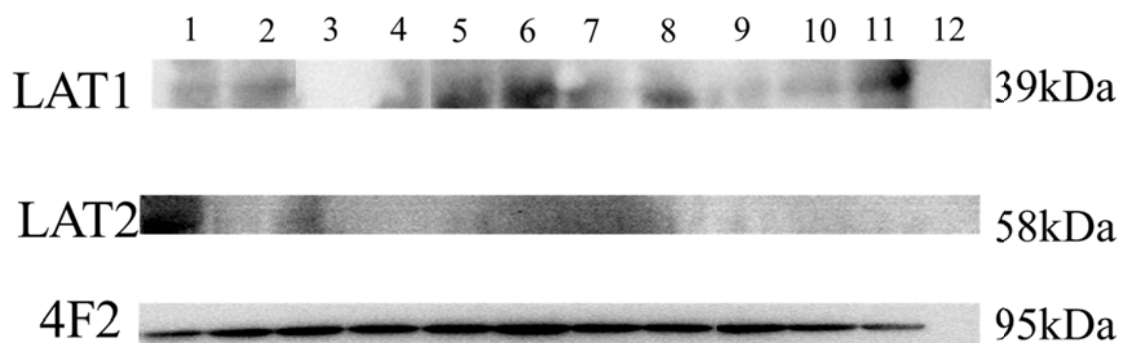


図 4. 腫瘍組織における LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白の発現

MCF-7 は LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白発現のポジティブコントロールとして示している。LAT1 蛋白の発現は肥満細胞腫、血管肉腫、骨肉腫、肺腺癌、肝細胞癌、悪性黒色腫、肛門囊腺癌、乳腺腫瘍で認められ、一方 LAT2 蛋白の発現は繊維肉腫でのみ認められた。4F2 蛋白の発現は全ての腫瘍でその発現が認められた。

Lane 1: MCF-7、Lane 2: 肥満細胞腫、Lane 3: 繊維肉腫、Lane 4: 血管肉腫、Lane 5: 骨肉腫、Lane 6: 肺腺癌、Lane 7: 肝細胞癌、Lane 8: 悪性黒色腫、Lane 9: 肛門囊腺癌、Lane 10: 乳腺腫瘍、Lane 11: 精巣腫瘍、Lane 12: mock control。

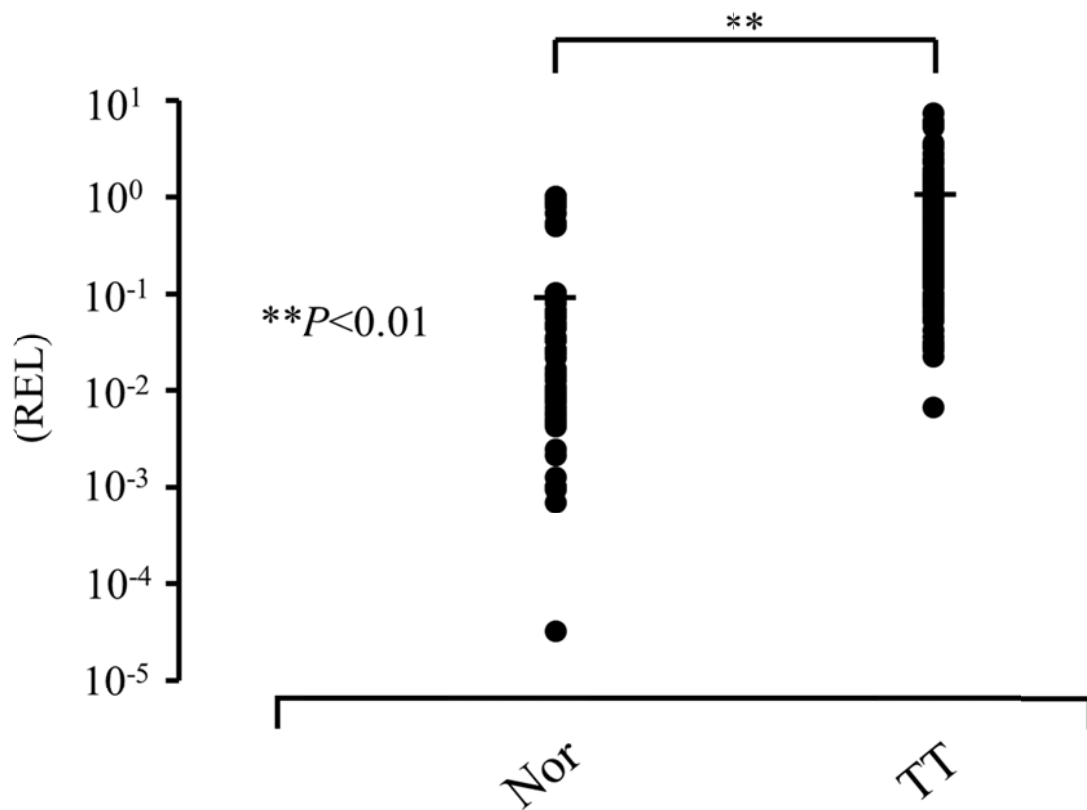


図 5. 犬正常組織と腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量

犬正常組織 (Nor) および腫瘍組織 (TT) における *LAT1* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT1* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量は正常組織と比較して有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

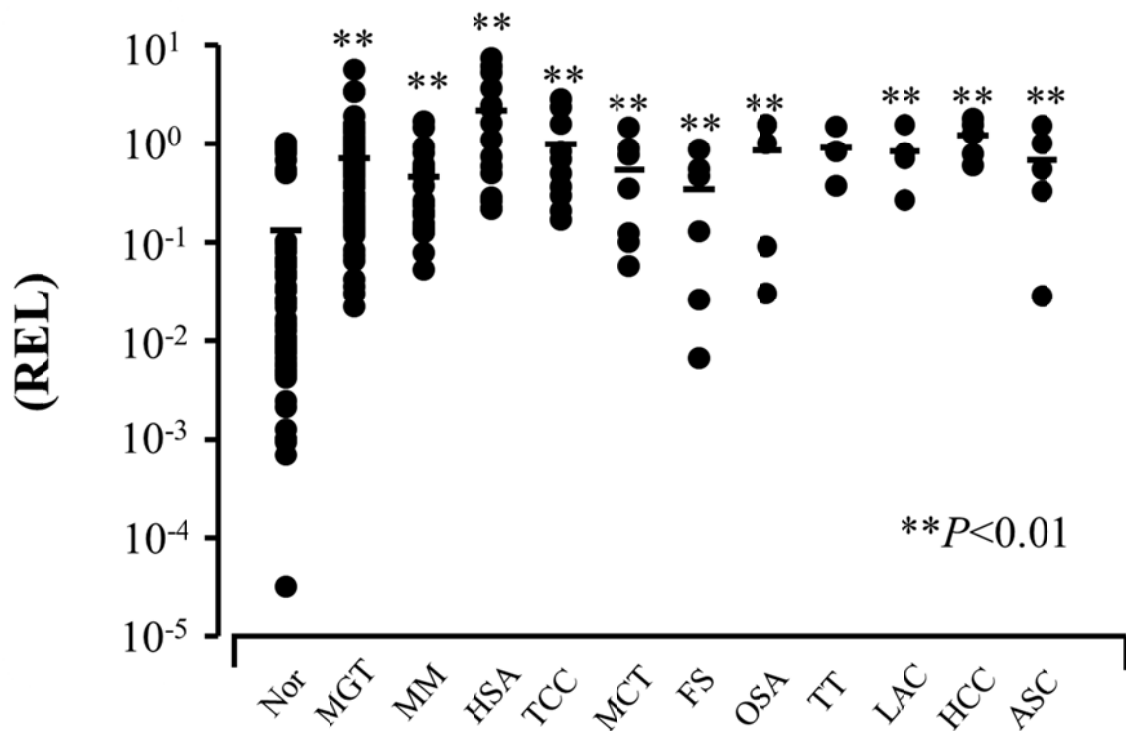


図 6. 犬正常組織と様々な種類の腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量

犬正常組織 (Nor) および腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT1* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。**は、正常組織と比較し、腫瘍組織で有意 ($P < 0.01$) に *LAT1* mRNA の発現量が上昇していることを示している。

MGT: 乳腺腫, MM: 悪性黒色, HSA: 血管肉腫、TCC: 移行上皮癌、MCT: 肥満細胞腫、FS: 線維肉腫、OSA: 骨肉腫、TT: 精巣腫瘍、LAC: 肺腺癌、HCC: 肝細胞癌、ASC: 肛門囊腺癌、●: それぞれの組織における REL, —: REL の平均値

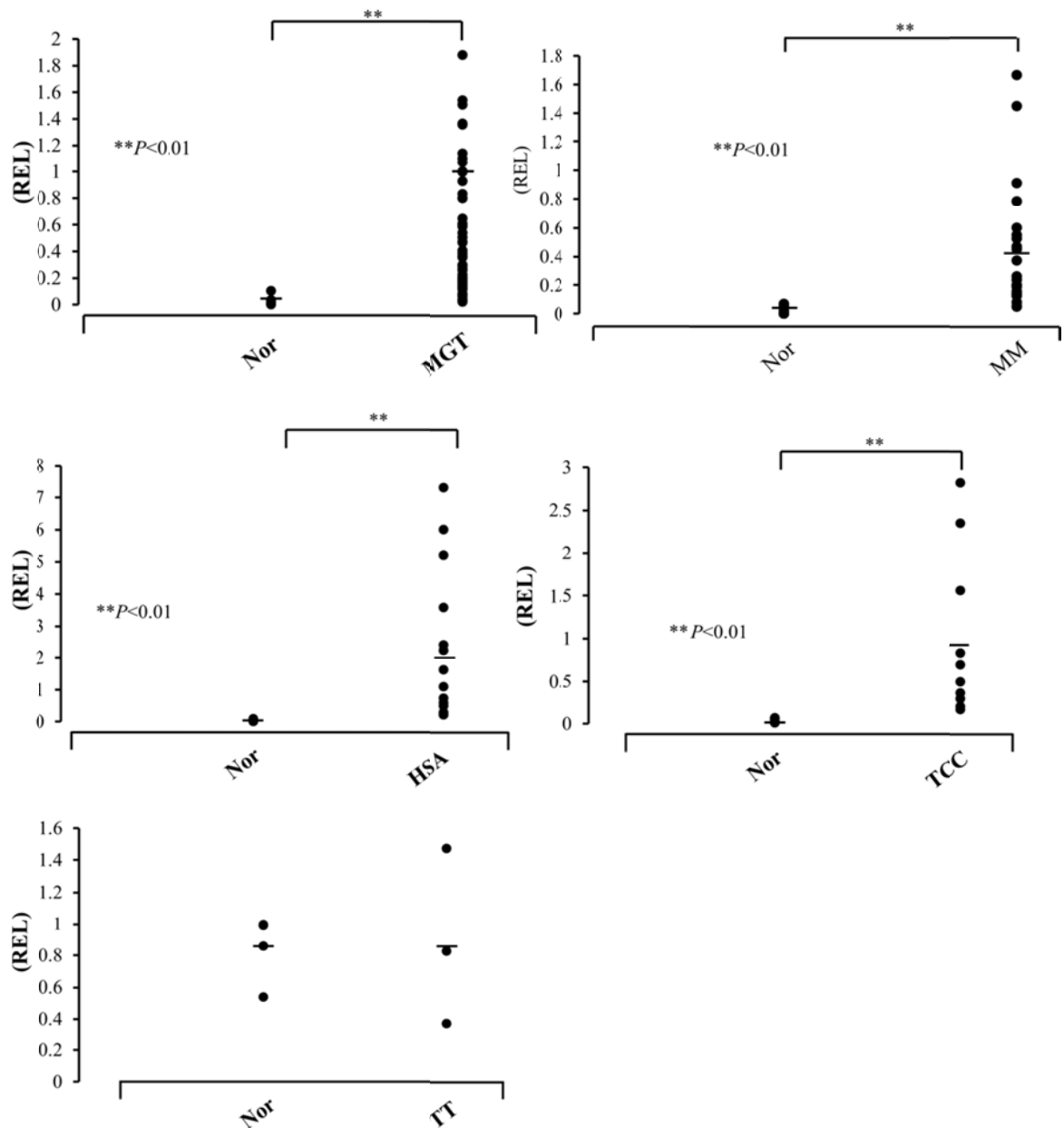


図 7. 乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、移行上皮癌および精巣腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量の変化

乳腺腫瘍組織 (MGT)、悪性黒色腫組織 (MM)、血管肉腫組織 (HSA)、移行上皮癌組織 (TCC) および精巣腫瘍組織 (TT) における *LAT1* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定し犬の各正常組織 (Nor) と比較した。*LAT1* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬乳腺腫瘍組織、悪性黒色腫組織、血管肉腫組織および移行上皮癌組織における *LAT1* mRNA の発現量は正常組織と比較し、それぞれ有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。精巣腫瘍の *LAT1* mRNA 発現量には有意な変化は認められなかった。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

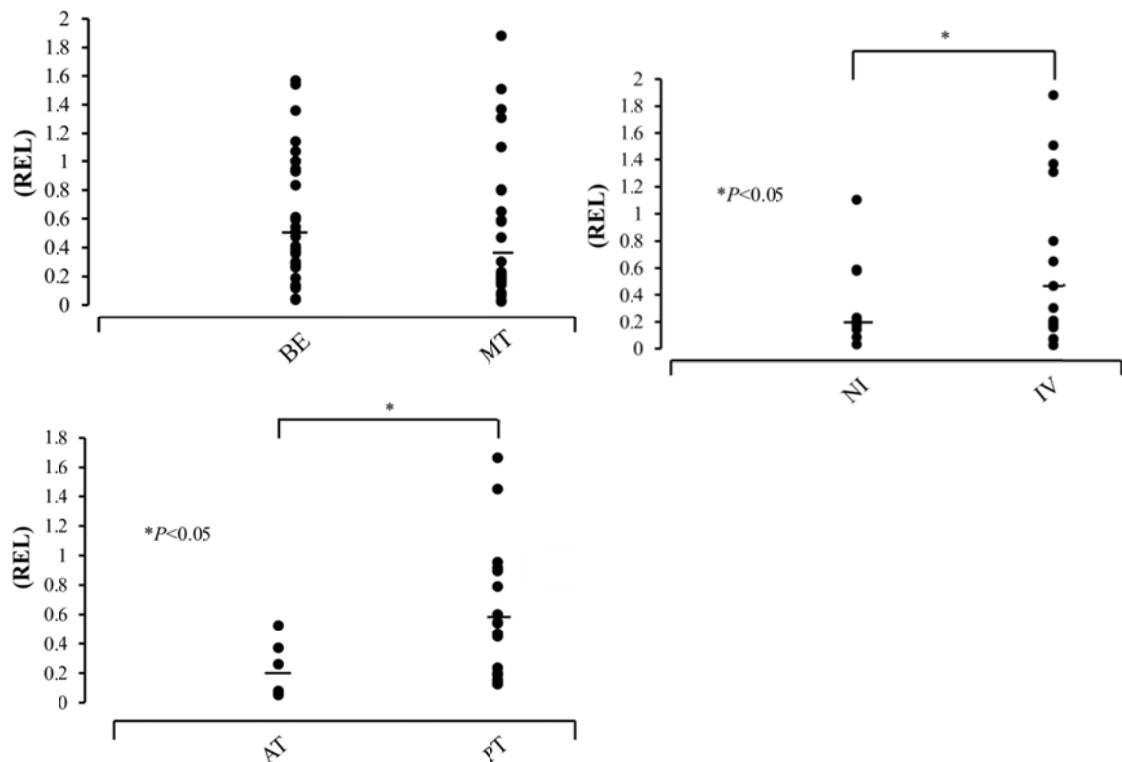


図 8. 犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫の腫瘍性状と *LAT1* mRNA の発現量の関係

犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫における *LAT1* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT1* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬乳腺腫瘍組織において病理診断に基づき、*LAT1* の発現量を比較したが良性 (BE) と悪性 (MT) で有意な差は認められなかった。乳腺腫瘍において脈管浸潤を伴う群 (IV) での *LAT1* mRNA の発現量は、伴わない群 (NI) より発現量が有意 ($P<0.05$) に上昇していた。犬悪性黒色腫においてリンパ節や肺への転移を伴う群 (PT) での *LAT1* mRNA の発現量は、転移を伴わない群 (AT) より発現量が有意 ($P<0.05$) に上昇していた。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

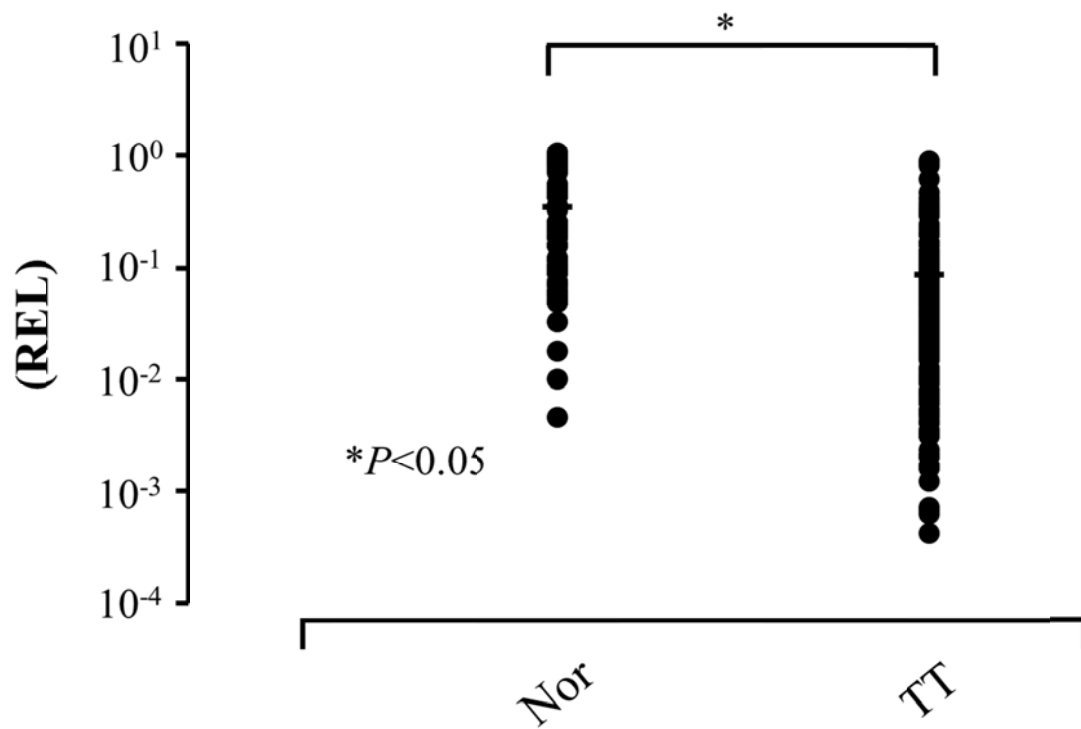


図 9. 犬正常組織と腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現比較

犬正常組織 (Nor) および腫瘍組織 (TT) における *LAT2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現量は正常組織と比較して有意 ($P < 0.05$) に低値を示した。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

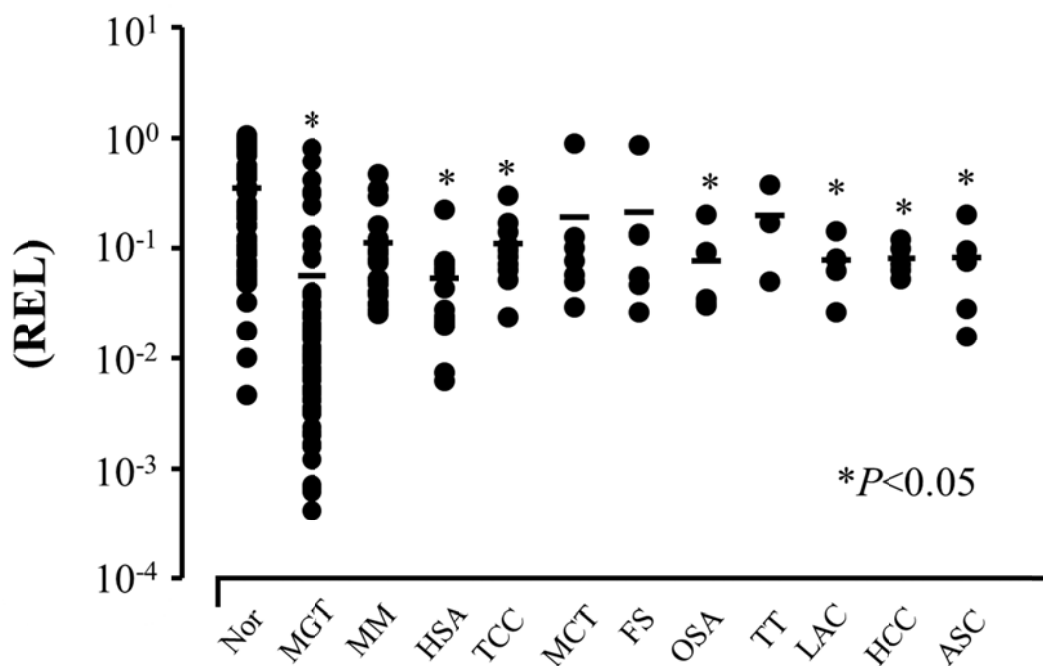


図 10. 様々な腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現量の変化

種々の腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定し犬正常組織 (Nor) と比較した。*LAT2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。* は、正常組織と比較し、腫瘍組織で有意 ($P < 0.05$) に *LAT2* mRNA の発現量が低下していることを示す。

MGT: 乳腺腫, MM: 悪性黒色, HSA: 血管肉腫、TCC: 移行上皮癌、MCT: 肥満細胞腫, FS: 繊維肉腫, OSA: 骨肉腫, TT: 精巣腫瘍, LAC: 肺腺癌, HCC: 肝細胞癌, ASC: 肛門嚢腺癌, ●: それぞれの組織における REL, —: REL の平均値

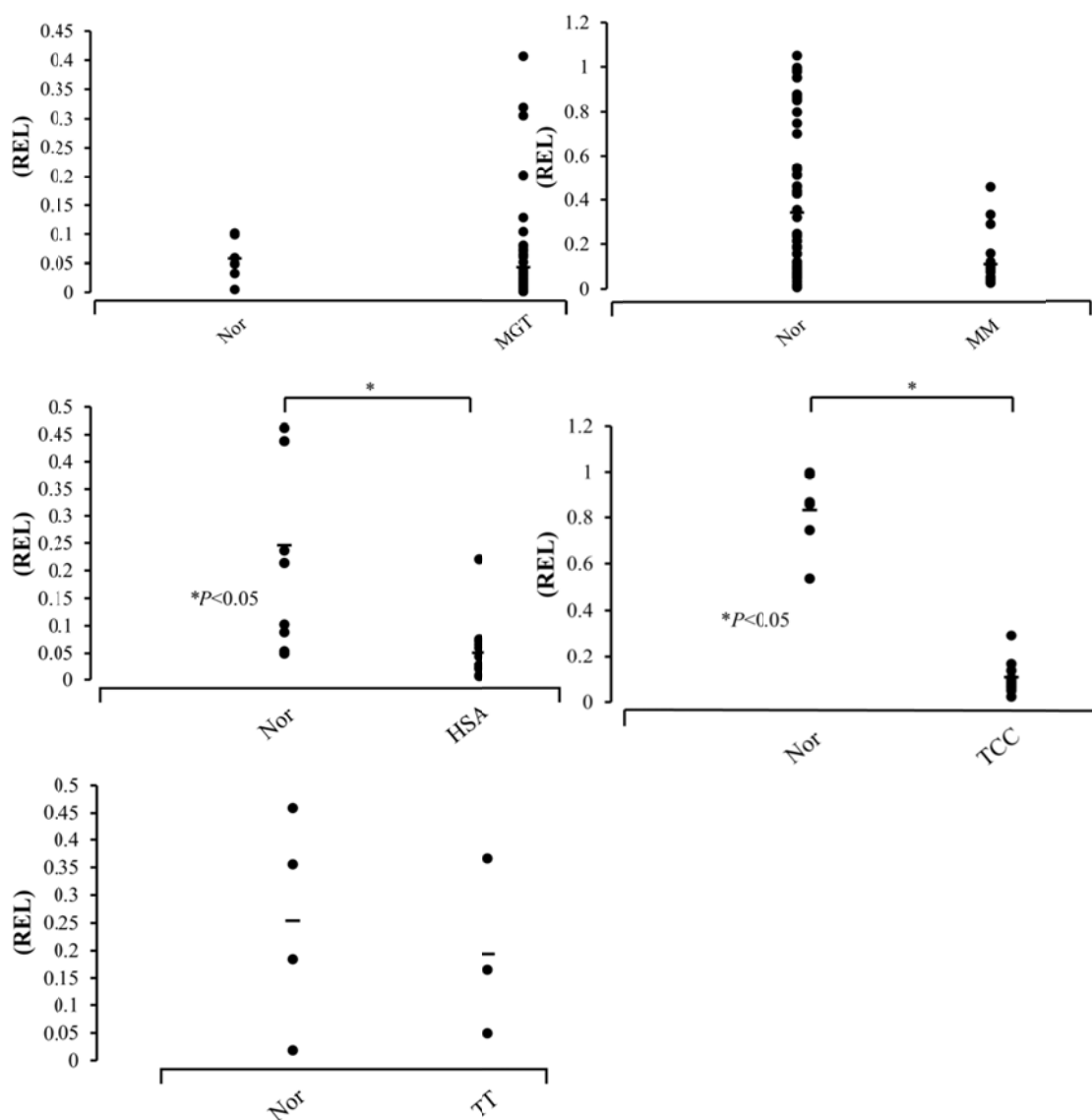


図 11. 犬正常組織と乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、移行上皮癌および精巣腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現量

犬正常組織 (Nor) と乳腺腫瘍組織 (MGT)、悪性黒色腫組織 (MM)、血管肉腫組織 (HSA)、移行上皮癌組織 (TCC) および精巣腫瘍組織 (TT) における *LAT2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定し比較した。*LAT2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。血管肉腫組織および移行上皮癌組織における *LAT2* mRNA の発現量は正常組織と比較してそれぞれ有意 ($P<0.05$) に低値を示した。一方、正常組織と犬乳腺腫瘍、悪性黒色腫および精巣腫瘍組織の *LAT2* mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

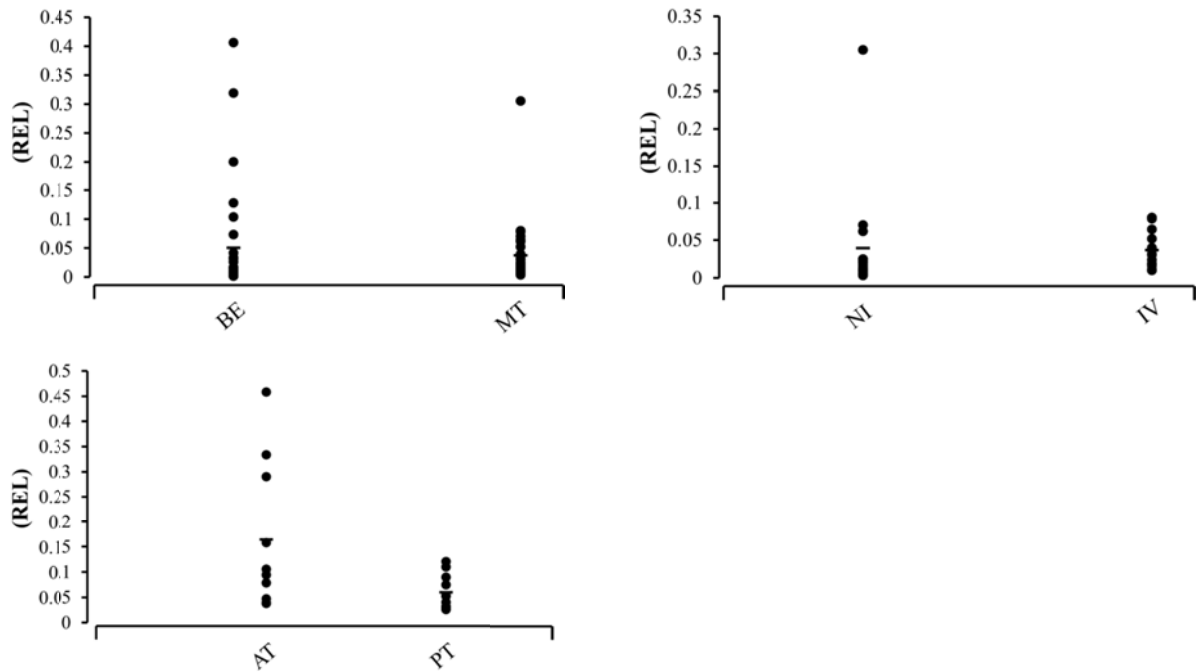


図 12. 犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫の腫瘍性状と *LAT2* mRNA の発現量

犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫における *LAT2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬乳腺腫瘍組織において病理診断に基づき、*LAT2* の発現量を比較したが良性 (BE) と悪性 (MT) で有意な差は認められなかった。乳腺腫瘍において脈管浸潤を伴う群 (IV) での *LAT2* mRNA の発現量と伴わない群 (NI) における発現量に有意な差は認められなかった。犬悪性黒色においてリンパ節や肺への転移を伴う群 (PT) での *LAT2* mRNA の発現量と転移を伴わない群 (AT) における発現量に有意な差は認められなかった。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

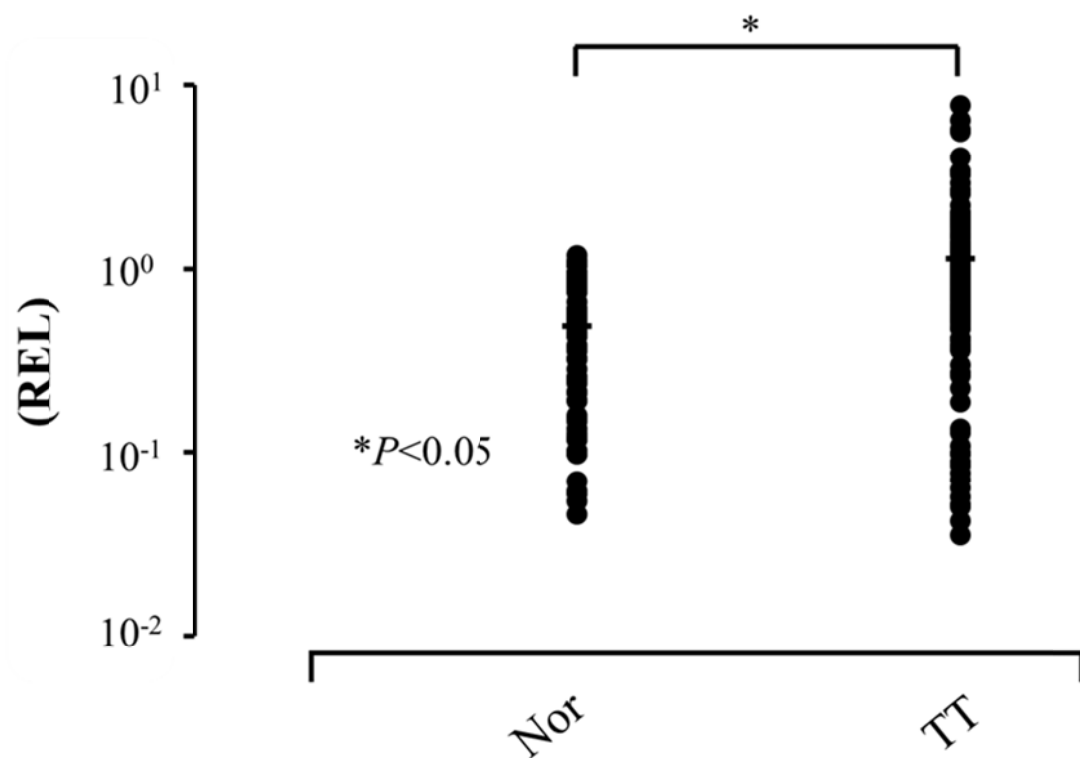


図 13. 犬正常組織と腫瘍組織における *4F2* mRNA の発現量

犬正常組織 (Nor) および腫瘍組織 (TT) における *4F2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*4F2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬腫瘍組織における *4F2* mRNA の発現量は正常組織と比較して有意 ($P<0.05$) に高値を示した。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

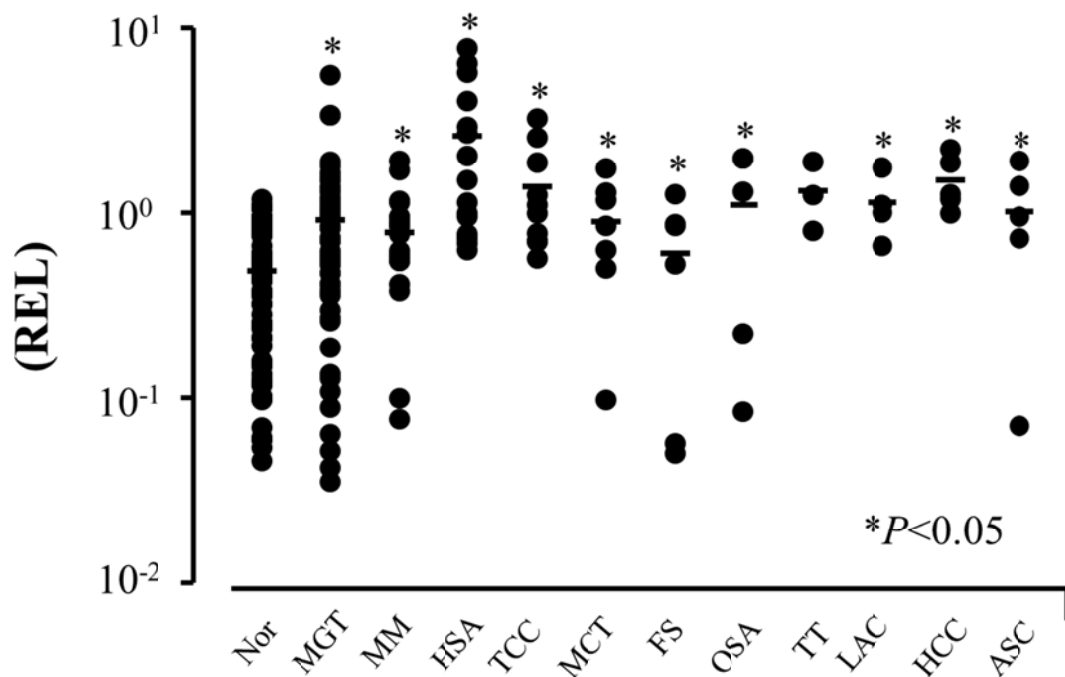


図 14. 犬正常組織と様々な種類の腫瘍組織における 4F2 mRNA の発現量

犬正常組織 (Nor) および腫瘍組織における *LAT2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT2* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。*は、正常組織と比較し、腫瘍組織で有意 ($P < 0.05$) に 4F2 mRNA の発現量が上昇していることを示している。

MGT: 乳腺腫, MM: 悪性黒色, HSA: 血管肉腫、TCC: 移行上皮癌、MCT: 肥満細胞腫, FS: 繊維肉腫, OSA: 骨肉腫, TT: 精巣腫瘍, LAC: 肺腺癌, HCC: 肝細胞癌, ASC: 肛門囊腺癌, ●: それぞれの組織における REL, —: REL の平均値

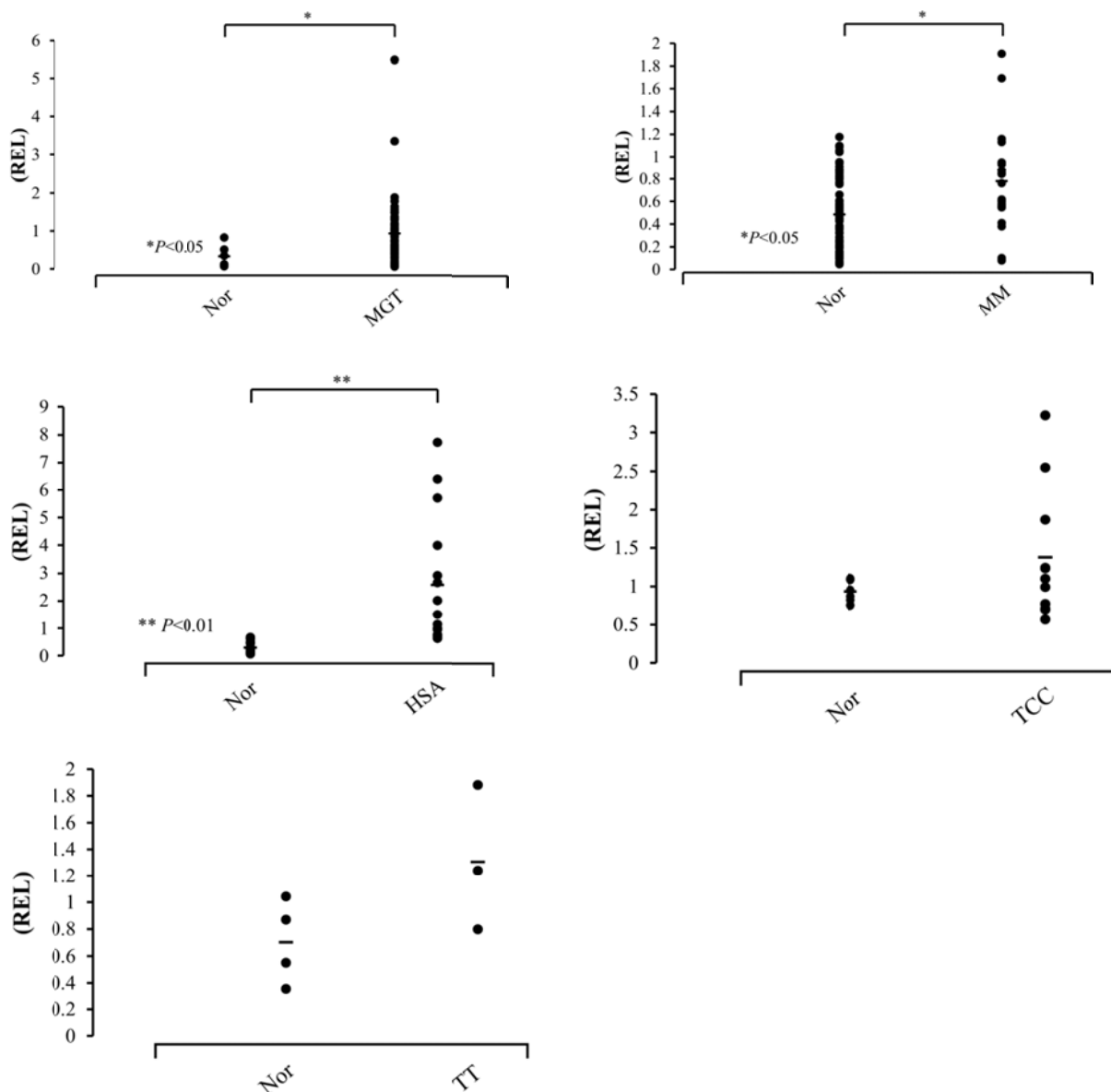


図 15. 犬正常組織と乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、移行上皮癌および精巣腫瘍組織における 4F2 mRNA の発現量の比較

犬正常組織 (Nor)と乳腺腫瘍組織 (MGT)、悪性黒色腫組織 (MM)、血管肉腫組織 (HSA)、移行上皮癌組織 (TCC) および精巣腫瘍組織 (TT) における *LAT1* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定し比較した。*LAT1* mRNA の相対発現量 (REL) は、*RP19* に対する発現量を計算することで求めた。犬乳腺腫瘍組織、悪性黒色腫組織および血管肉腫組織における 4F2 mRNA の発現量は正常組織と比較し、それぞれ有意 ($P<0.05$) に高値を示した。一方、正常な膀胱組織と移行上皮癌組織および正常な精巣組織と精巣腫瘍組織の 4F2 mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

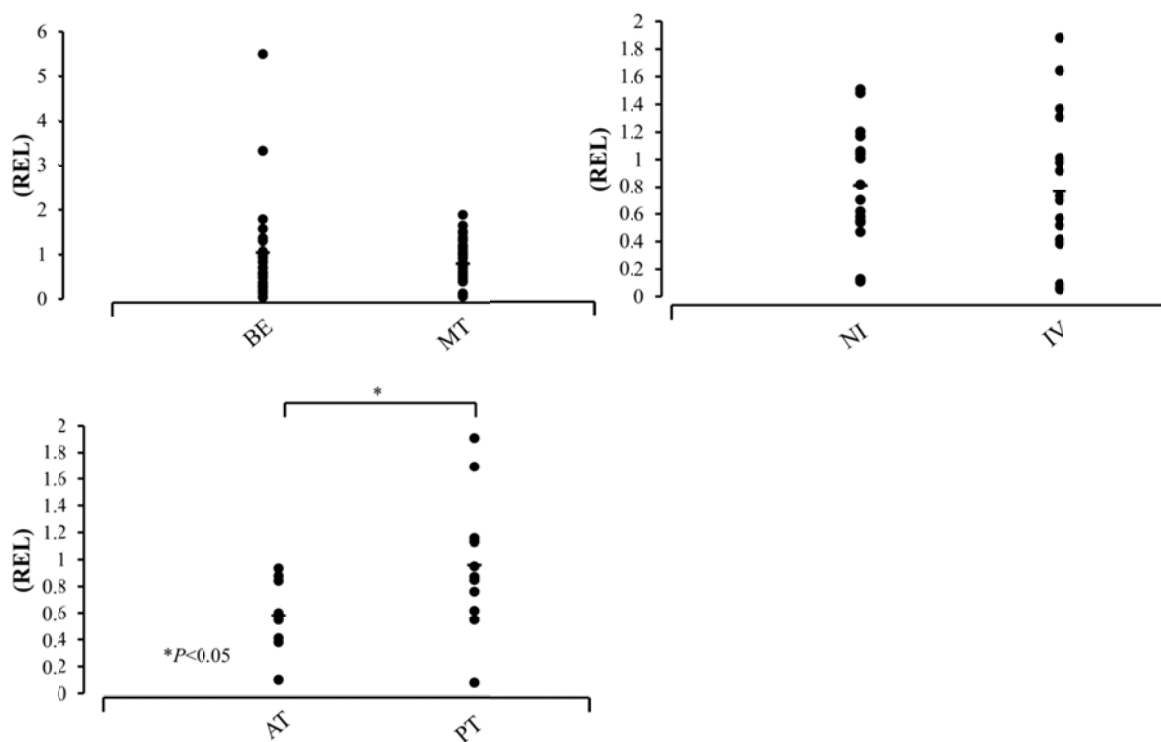


図 16. 犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫の腫瘍性状と 4F2 mRNA の発現量

犬乳腺腫瘍および悪性黒色腫における 4F2 mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。4F2 mRNA の相対発現量 (REL) は、RP19 に対する発現量を計算することで求めた。犬乳腺腫瘍組織において病理診断に基づき、4F2 の発現量を比較したが良性 (BE) と悪性 (MT) で有意な差は認められなかった。乳腺腫瘍において脈管浸潤を伴う群 (IV) と伴わない群 (NI) における 4F2 mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。犬悪性黒色においてリンパ節や肺への転移を伴う群 (PT) での 4F2 mRNA の発現量は、転移を伴わない群 (AT) より発現量が有意 ($P < 0.05$) に上昇していた。

●：それぞれの組織における REL, —：REL の平均値

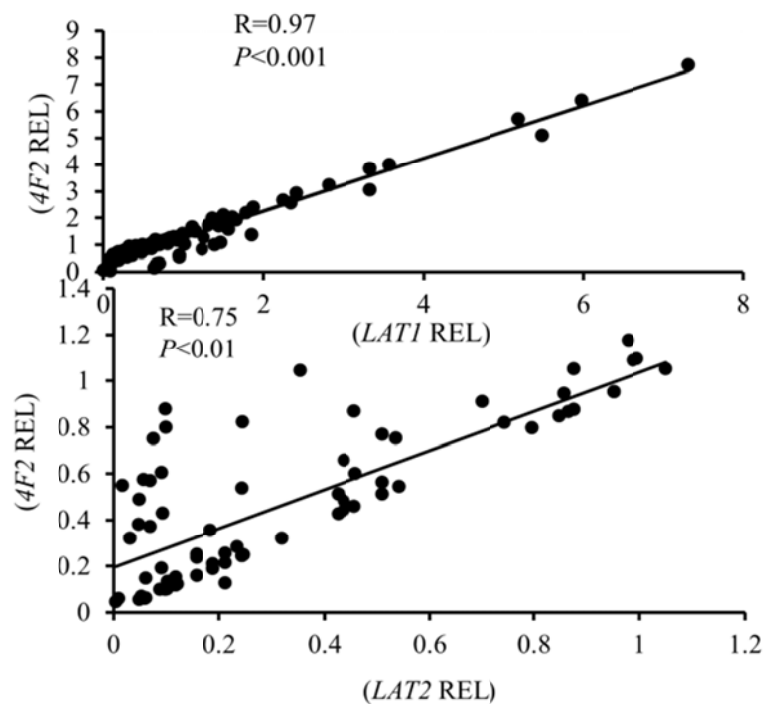
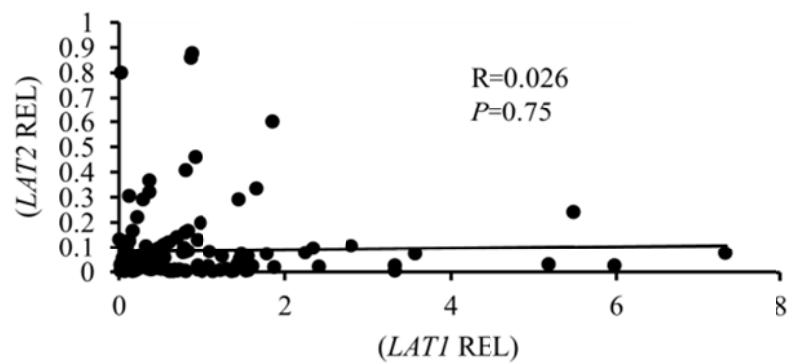


図 17. 犬腫瘍組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA 発現量の相関性

前述したように、犬腫瘍組織における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定し、*LAT1* mRNA 発現量と *LAT2* mRNA 発現量、*LAT2* mRNA 発現量と *4F2* mRNA 発現量および *LAT1* mRNA 発現量と *4F2* mRNA 発現量の相関性を検討した。*LAT1* mRNA 発現量と *4F2* mRNA 発現量間、*LAT2* mRNA 発現量と *4F2* mRNA 発現量の間に正の相関性が認められたが、前者では特に相関が極めて高かった ($R=0.97$ 、 $P<0.001$)。

4. 考察

腫瘍細胞は正常細胞にくらべ極めて盛んに分裂増殖を繰り返すため、多くのエネルギーを必要とする。それを補うために腫瘍細胞は、血管内皮細胞増殖因子やマトリックスメタロプロテアーゼなど様々な因子を放出することで栄養血管を腫瘍組織内へ誘導し、栄養血管から多くのエネルギー源（グルコースなど）を取り込む[25, 33]。グルコース要求量が正常組織の 6 倍に達する腫瘍も報告されている[13, 67, 77]。グルコースと同様に細胞にとってアミノ酸は細胞を構成する構造蛋白や種々の機能蛋白の合成に必須であり、増殖の盛んな細胞ほどその重要性は増す。LAT1 は腫瘍細胞で要求量が増加したアミノ酸を細胞内に供給する役割を果たしているものと考えられており[26, 57]、LAT1 を阻害することで腫瘍細胞の増殖を抑制できるとの報告もある[17, 29, 61, 74]。

2002 年に人において PET が腫瘍診断のために保険認可されて以来、人医療において、腫瘍診断のための PET の利用が普及してきている。一方で、獣医学領域において 2009 年に獣医療法施行規則が改正され、獣医学領域においても PET を臨床応用することが可能になったが、獣医学領域で PET を用いた腫瘍の診断に関する報告は限られている[3, 44]。従来から PET は腫瘍細胞のグルコース消費量が高いことに着目し、FDG が腫瘍組織に集中することを利用した画像診断であるが、偽陽性、偽陰性を示すことも多く新たな基質が必要とされている[3, 44]。最近では、腫瘍組織で LAT1 が高発現していることに注目し、腫瘍組織にアミノ酸が集積することを利用した PET 診断法が人医療で検討されている[27]。本研究で、犬の乳腺腫瘍、血管肉腫、肥満細胞腫、骨肉腫など広範囲に渡る腫瘍において、人と同様に LAT1 mRNA の発現量が増加していることを示した。また、LAT1 mRNA 発現量に基づく犬腫瘍の診断は感度、特異度および正診率に優れていることも示した。これらの結果は、犬腫瘍の新たな診断法として LAT1 を介したアミノ酸取り込みに注目した PET が犬においても有用であることを示す根拠となる。

人の乳癌、膵臓癌、胃癌、非小細胞肺癌において LAT1 および 4F2 mRNA の発現量が遠隔転移を伴う症例や腫瘍径の大きい症例で上昇していると報告されており、これら発現量と腫瘍の生物学的性状や予後との関連性が指摘されている [21, 26, 35, 93]。本研究で十分な症例数を確保できた犬乳腺腫瘍について、予後と関連するとされてい

る脈管浸潤と *LAT1* mRNA の発現量との関連を検討したところ、脈管浸潤の認められる犬乳腺腫瘍は認められない腫瘍に比べ有意に *LAT1* mRNA の発現量が上昇していた。この結果は、犬乳腺腫瘍の予後と *LAT1* mRNA の発現量が関連することを示唆しており、今後罹患犬の追跡調査を行って、発現量と予後（生存期間など）の関連性を明確に証明していく必要がある。病理組織学的に良性の乳腺腫瘍と悪性の乳腺腫瘍を *LAT1* mRNA 発現量について比較した場合、発現量の間には有意な差は認められなかった。これは組織学的に悪性と診断された腫瘍の中に臨床的に悪性挙動を示さないものが半分含まれることに関連するかもしれない。Thompson らは *LAT1* の過剰発現が腫瘍化の初期段階に起こる可能性を示しており[82]、このことを踏まえると乳腺腫瘍における *LAT1* の発現は、組織学的な悪性度とは関係なく、腫瘍化の初期から増加したアミノ酸要求量に対応するため増加するとも考えられる。

LAT1 と *LAT2* mRNA の発現比較から、犬においても人と同様に正常組織では *LAT2* を介してアミノ酸の取り込みが、腫瘍組織では *LAT1* を介してアミノ酸の取り込みが主要経路であることが示された。細胞が腫瘍化することで、胎児期に発現がみられる *LAT1* にアミノ酸取り込み経路がスイッチすることは大変興味深い。このスイッチ機構については不明であるが、腫瘍胎児性蛋白質の発現調節機構について研究が進めば、腫瘍組織における *LAT1* の過剰発現を遺伝子レベルで抑制する治療法の開発につながる可能性がある。

5. 小括

本章では、犬の腫瘍組織において *LAT1* mRNA、*LAT2* mRNA および *4F2* mRNA の発現を解析し、

1)多くの腫瘍（乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌）において *LAT1* mRNA の発現が確認された。*LAT1* mRNA の発現量は正常組織と比較して腫瘍組織において上昇しており、発現量の変化を感度、特異度、正診率に優れた診断マーカーとして利用できる可能性が示された。また、犬乳腺腫瘍および犬悪性黒色腫において *LAT1* mRNA の発現量は予後因子の一つとなる可能性も示された。

2) *LAT2* mRNA の発現は正常組織と比較し腫瘍組織で低下していた。

3) 4F2 mRNA の発現は、多くの腫瘍（乳腺腫瘍、線維肉腫、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌）において確認され正常組織と比較し高値を示した。

4) 犬腫瘍における *LAT1* mRNA と 4F2 mRNA、*LAT2*mRNA と 4F2 mRNA の発現の間に有意な相関が認められたが、前者の相関は特に強いものであった。

以上より種々の犬の腫瘍組織において *LAT1* および 4F2 mRNA が高発現することが確認された。このことは *LAT1* mRNA の発現量は犬腫瘍の診断マーカーおよび予後因子の一つとして有用である可能性を示唆する。

第Ⅲ章 LAT1 に関する機能実験および臨床応用への基礎的研究

1. 序文

第ⅠおよびⅡ章での犬の組織における発現解析を通し、LAT1 は犬においても人と同様に腫瘍組織で特異的に発現する腫瘍胎児性蛋白の 1 つであることが示された。人の乳癌、卵巣腫瘍および非小細胞肺癌では、この LAT1 の腫瘍特異的な発現特性に加え、腫瘍細胞にアミノ酸を供給するトランスポーターとしての機能に着目し、LAT1 の特異的阻害剤を用いた腫瘍の新規治療法の検討がなされている[17, 29, 38]。犬においても LAT1 が腫瘍細胞の生命活動に重要なアミノ酸を輸送する担体としての機能を担っているとすれば、医学領域で検討されている LAT1 に着目した治療法を犬の腫瘍に応用することが可能となる。しかしながら、LAT1 の腫瘍組織での機能について獣医領域で検討した報告はない。

犬の腫瘍にはリンパ腫、肥満細胞腫、線維肉腫、乳腺腫瘍、悪性黒色腫、骨肉腫、扁平上皮癌、血管肉腫など様々な悪性腫瘍があるが[2, 6, 19, 20, 28, 59, 72, 80]、その中でも乳腺腫瘍は、獣医学領域で最も一般的な腫瘍で雌犬では発生率が非常に高い腫瘍である[22, 81]。病理組織診断では、悪性および良性がそれぞれ約 50%であると報告されており[22]、病理組織学的に悪性と診断された症例の 50%は臨床的にも悪性挙動を示し、肺などへの遠隔転移を伴う[4]。乳腺腫瘍の一般的な治療法は外科的切除であるが、臨床的に悪性挙動を示し遠隔転移を伴う症例での有効な治療法は確立されていない。多くの場合、手術や放射線などの局所コントロールに加え全身的な化学療法が考慮されるが、乳腺腫瘍に対する有効な薬剤、プロトコールについての報告はない[78]。

本章では、LAT1 の高発現が確認されている犬の乳腺腫瘍に着目し、人の腫瘍と同様に LAT1 阻害剤が新規の治療薬として有用であるかを検討するために、犬乳腺腫瘍由来株化細胞を用い、LAT1 の機能解析を行った。

2. 材料と方法

1) 材料および株化細胞の継代

犬乳腺腫瘍由来株化細胞 (CHM-M、RCM-KI、RCM-SA、RCM-Mc、RCM-Mp) を用いた。CHM-M は東京大学獣医外科学教室で樹立され[31, 51]、好意により本学に譲渡された。また、RCM-KI、RCM-SA、RCM-Mc、RCM-Mp は本学伴侶動物外科学Ⅱ

にて 50 代以上継代された後、細胞株として樹立された。これらの株化細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Life Technologies) に、それぞれ 2 mM L-glutamine、10% 非働化ウシ胎児血清、50 IU/mL ペニシリンおよび 50 μ g/mL ストレプトマイシンを添加し、5% CO₂、37 °C で継代した。継代培養は、顕微鏡による観察下において培養細胞が 10cm シャーレで 70~80% コンフルエントに達した時点に行った。シャーレの培地を除去し、PBS で洗浄し、0.25%Trypsin-EDTA を 1ml 添加し、37°C、5% CO₂条件下で約 5 分間インキュベートした。細胞がシャーレ底面から剥離されているのを顕微鏡下で確認し、9ml の培養液を添加しピペットでよく混和することで細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を 10ml の培養液を加えたシャーレに 1.0×10^6 個細胞を接種し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。ヒト乳癌由来株化細胞 MCF-7 は前章と同様の方法で培養を行った。

Total RNA の抽出のためには、株化細胞を 0.25%Trypsin-EDTA を用いて浮遊させ、細胞数を 1.0×10^6 に調整したのち、室温 8,000 $\times$ g で 5 分間遠心し、細胞ペレットを作成した。細胞ペレットを 4°C で RNAlater (Applied Biosystems) に 30 分間浸漬し、RNAlater 除去後-80°Cで保存した。また、蛋白質解析のために細胞ペレットを無処置のまま-80°Cで保存した。

2) 遺伝子発現

第 I 章と同様に qRT-PCR を用いて株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA 発現を解析した。

3) 蛋白発現 (ウェスタンブロット)

第 I 章と同様にウェスタンブロットを用いて株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* 蛋白質発現について解析した。

4) アミノ酸取り込み抑制試験

アミノ酸取り込み抑制試験は *LAT1* 阻害剤である BCH (2-amino-2-norbornane-carboxylic acids) もしくはメルファラン(LPM) の存在下で、*LAT1* の基質である

[³H]L-leucine (Nihon Medi-Physics Co Ltd, Tokyo, Japan) の細胞内取り込み量の減少を評価することで行った。LAT1 を介するアミノ酸取り込みはナトリウム非依存性であるために、抑制試験はナトリウムを含まないアミノ酸取り込み溶液 (125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.6 mM glucose, pH 7.4) 中で行った。24 ウェルプレートに細胞を 1 ウェルあたり 1×10⁵ 個接種し、37℃、5% CO₂ で 24 時間培養した。抑制試験は細胞が 85~95% コンフレントに達した時点で行った。培地を取り除いた後、細胞を 3 回アミノ酸取り込み溶液で洗浄した。アミノ酸取り込み溶液で 37℃、10 分間インキュベートした後、1 ウェルあたり 500μl の 1μM [³H]L-leucine を含んだアミノ酸取り込み溶液に置換した。BCH は 0、1、3、10、30、100 μM の濃度、LPM は 0、0.1、0.3、1、3、10μM の濃度となるように調整した。LAT1 を介するアミノ酸取り込みは時間依存性であることが報告されていることから[39, 94]、アミノ酸暴露時間を 1 分間とし、37℃、5%CO₂ でインキュベートした。アミノ酸取り込み溶液を氷温で冷却し、取り込みを停止させた後、冷却した取り込み溶液で細胞を 3 度洗浄した。細胞を 0.1N の NaOH で溶解後、液体シンチレーションカウンター (LSC-6000B, Hitachi Aloka Medical, Ltd, Tokyo, Japan) を用いて [³H]L-ロイシン の取り込み量を測定した。LAT1 阻害剤である BCH や LPM を含まない溶液を用いた際の取り込みに対して、阻害剤を含む溶液での取り込みの割合を算出し、その結果をもとに IC₅₀ を求めた。それぞれの濃度で 3 回実験を実施しその平均値を算出した。

5) 細胞増殖抑制試験 (WST-8 アッセイ)

CHM-M を用いて LAT1 阻害剤による細胞増殖抑制試験を行った。96 ウェルプレートの各ウェルに 5×10³ 個の細胞を接種し、フェノールレッドを含まない DMEM 培地に、それぞれ 2mM の L-グルタミン酸、10%FBS を添加し、37℃、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、フェノールレッドを含まない DMEM に BCH もしくは LPM を添加した培養液中で 48 時間培養した。BCH は 0.1、0.3、1、3、10、30、100 mM の濃度、LPM は 1、3、10、30、100、300、1,000 μM の濃度となるように調整して実験を行った。WST-8 (DOJIN, Kumamoto, Japan) を用いて細胞増殖性を評価した。LAT1 阻害剤である BCH や LPM を含まない溶液を用いた際の増殖性に対して、阻害剤を含む

溶液での増殖性の割合を算出し、その結果をもとに半分効果濃度 (IC_{50}) を求めた。それぞれの濃度で 6 回の実験を実施しその平均値を算出した。

6) 抗癌剤と LAT1 阻害剤を組み合わせた際の細胞増殖抑制

一般に抗癌剤は単剤ではなく 2 種類以上の薬剤を併用させることが多いので、汎用抗癌剤と LAT1 阻害剤を組み合わせることで細胞増殖抑制が増強されるか CHM-M 用 WST-8 アッセイにて検討した。抗がん剤として獣医臨床領域で一般的に用いられている薬剤である carboplatin、cyclophosphamide、doxorubicin、mitoxantrone、vinblastine および vincristine を選択した。Carboplatin を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ M、cyclophosphamid を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100mM、doxorubicin を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ M、mitoxantrone を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ M、vinblastine を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ M、vincristine を 0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 μ M の濃度となるように調整して BCH および LPM は、それぞれ IC_{50} の濃度になるように調整し併用実験を行った。

7) ノードマウスを用いた melphalan, mitoxantrone の単独および併用効果の検討

[1] X 線照射

腫瘍移植に先立ち、腫瘍の生着率を向上させることを目的に胸腺欠損雄ノードマウス (BALB/cAJcl-nu(nu/nu)、5 週齢、日本クレア：以下、ノードマウス) へ X 線全身照射を行った。照射には、X 線発生装置 (HF-320、SHIMADZU) を用い、管電圧 300kv、電流 10mA、1.0mmCu-1.0mmAl フィルターを使用した照射条件にて、線量率 0.9Gy/min で 4Gy 照射した。照射はノードマウスをエチレンオキシドガスで滅菌処理された紙製の箱に 3 匹ずつ入れ行った。また、ノードマウスを用いた実験は、酪農学園大学動物実験委員会にて審査を受け、動物の取り扱い規定に従って行った。

[2] 培養細胞の移植および抗癌剤の投与

培養細胞浮遊液 (5×10^6 細胞/0.3ml) を調整し、これをクリーンベンチ内でノードマウスの右臀部皮下に 23 ゲージの注射針 (TERUMO)、1ml シリンジ (TERUMO) を用いて 0.3ml 皮下注射し、培養細胞の移植を行った。実験はコントロール群 (5 匹)、

melphalan 投与群 (5 匹)、mitoxantrone 投与群 (5 匹)、melphalan + mitoxantrone 投与群 (5 匹) に分け行った。腫瘍体積が 100mm^3 に達した時点で薬剤の投与を開始した。腫瘍体積は、ヌードマウスへ移植した細胞が生着した後、腫瘍の長径 (L, mm) および直交する短径 (W, mm) を 3 日ごとに定規を用いて実測し、過去の報告に基づき以下の式から推測腫瘍体積 (mm^3) を算出した。なおコントロール群に関しては生理食塩水を投与した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 0.5 \times L \times W^2$$

ヌードマウスの飼育は、個別換気方式ラック (SEOBiT) 内で行い、飼育法は 1 ケージあたり 3 匹で飼育し、飼料はコバルト γ 線 30kGy で滅菌された固形飼料(CE-2、日本クレア)、飲水はオートクレーブ滅菌 (121°C 、15 分) した水道水を給与した。

抗癌剤は、過去の報告に基づきヌードマウスの血中濃度が獣医臨床上適切な濃度となるように投与した。なお、mitoxantrone と melphalan の投与量は犬に mitoxantrone $5\text{mg}/\text{m}^2$ (IV、3 週間毎)、melphalan $0.1\text{mg}/\text{kg}$ (PO、SID) で投与した際の血中濃度を参考にして設定した[50, 90]。

[3] 採材

株化細胞接種後に腫瘍体積が人道的エンドポイントの大きさに近づいた場合は麻酔薬 (ソムノペンチル、共立製薬) を腹腔内投与($10\text{mg}/\text{kg}$)し、ヌードマウスが麻酔状態であることを確認して、頸椎脱臼により安楽殺処置を行った。その後、病理解剖を行い腫瘍および全身の臓器を採材し、ただちに 4% パラホルムアルデヒドに浸漬した。

[4] 病理組織学的検索 (HE 染色)

固定した組織をパラフィン包埋し、それを厚さ $4\mu\text{m}$ に薄切しパラフィン切片を作製した。作製された切片をキシレンとエタノールを用い脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。光学顕微鏡にて観察し、病理組織学的検索を行った。

8) 統計解析

各正常組織、腫瘍組織および株化細胞間の *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量を比較するためにマン・ホイットニーU 検定にて統計学的に分析した。また、ヌードマウスに接種した腫瘍体積の比較もマン・ホイットニーU 検定にて分析した。危険率 (*P*) が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意差ありと判定した。データ分析はエクセル統計 2010 (SSRI) で行なった。また、アミノ酸取り込み抑制試験および増殖抑制試験から IC₅₀ を算出する際には、Origin 7 software (Origin Lab) を用いて実施した。

3. 結果

1) 株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* の発現

[1] *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現

犬乳腺腫瘍由来株化細胞において *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量を検索し、正常な組織、乳腺腫瘍組織での発現量と比較した。*LAT1* mRNA の発現量は正常乳腺組織 (0.026 ± 0.038) と比較して、乳腺腫瘍組織 (0.70 ± 0.91) および乳腺腫瘍由来株化細胞 (1.9 ± 1.9) で有意 ($P < 0.01$) に高値を示した (図 18)。一方、*LAT2* mRNA の発現量には乳腺腫瘍組織 (0.043 ± 0.076)、乳腺腫瘍由来株化細胞 (0.24 ± 0.53)、正常乳腺組織 (0.057 ± 0.057) 間で著明な差は見られなかった(図 18)。*4F2* mRNA の発現量は、*LAT1* mRNA と同様に正常乳腺組織 (0.30 ± 0.29) と比較し、乳腺腫瘍 (0.90 ± 0.87) および乳腺腫瘍由来株化細胞 (3.1 ± 1.6) で有意 ($P < 0.01$) に高値を示した(図 18)。

以上の解析から犬乳腺腫瘍組織と同程度の *LAT1* mRNA 発現量 (REL: 0.2~1.8) を示す株化細胞は CHM-M (REL: 1.2)であることが明らかになった。

[2] 株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* 蛋白質の発現

犬乳腺腫瘍由来株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* の蛋白質レベルでの発現をウェスタンブロット法により解析した。*LAT1* および *4F2* 蛋白質の発現は、犬乳腺腫瘍由来株化細胞においては CHM-M、RCM-KI、RCM-SA、RCM-Mc、RCM-Mp の全てで認められた。一方、*LAT2* 蛋白質は RCM-KI でのみで発現が認められた。

これらの細胞株のうち、CHM-M は (1) *LAT1* mRNA の発現量が乳腺腫瘍組織と同程度であること、(2) *4F2* の発現が認められること、(3) *LAT2* の発現が認められないことの条件を満たすことから、以後の機能解析実験には CHM-M を用いることと

した (図 18、19)。

2) LAT1 阻害剤によるアミノ酸取り込み抑制試験

LAT1 阻害剤である BCH と melphalan を用いてアミノ酸取り込み抑制試験を CHM-M にて実施した。アミノ酸の取り込みは処置した LAT1 阻害薬の濃度に依存し抑制された (図 20)。CHM-M における BCH および melphalan による IC_{50} はそれぞれ $1.6 \pm 0.05 \mu M$ 、 $0.16 \pm 0.05 \mu M$ であった (図 20)。

3) LAT1 阻害剤による細胞増殖抑制試験

LAT1 阻害剤である BCH や melphalan を用いて細胞増殖抑制試験を実施したところ、CHM-M の細胞増殖は処置した LAT1 阻害薬の濃度に依存し抑制された (図 21)。CHM-M における BCH および melphalan による IC_{50} はそれぞれ $48.2 \pm 3.5 mM$ 、 $18.9 \pm 2.3 \mu M$ であった (図 21)。

4) LAT1 阻害剤と抗癌剤の併用による細胞増殖抑制

獣医学臨床で一般的に使用されている抗癌剤に LAT1 阻害剤である BCH や melphalan を組み合わせて用いた時の細胞増殖抑制効果を検討した。抗癌剤を単独で用いた場合と比較し LAT1 阻害剤を併用した場合、抗癌剤の IC_{50} は有意 ($P < 0.05$) に低下した (表 11)。この結果から、LAT1 阻害剤には抗癌剤の作用を増強する効果があるものと考えられた。

BCH は LAT1 に加え、正常組織で発現している LAT2 に対しても阻害作用を示すため[39, 85, 92]、BCH を *in vivo* の実験に用いる場合、LAT2 阻害作用に基づく副作用が出る可能性がある[14]。また doxorubicin は長期的な投与により心毒性を有すること[10]、cyclophosphamide、vincristine および vinblastine は犬乳腺腫瘍の治療に有用でないこと[91]から、以後の *in vivo* での実験に LAT1 阻害薬として melphalan、抗癌剤として mitoxantrone を選択し、抗腫瘍効果について検討を行った。

5)ヌードマウスを用いた melphalan, mitoxantrone の単独および併用効果の検討

[1] 腫瘍増殖に及ぼす melphalan, mitoxantrone の単独および併用効果

ヌードマウスに接種した CHM-M の平均腫瘍体積が 100mm^3 に達した時点で抗癌剤の投与を開始した。腫瘍接種後 31 日目の腫瘍体積は、コントロール群、melpahalan 群、mitoxantrone 群および melphalan + mitoxantrone 群でそれぞれ、 $4,242 \pm 1,153 \text{ mm}^3$ 、 $1,399 \pm 512 \text{ mm}^3$ 、 $322 \pm 277 \text{ mm}^3$ および $67 \pm 67 \text{ mm}^3$ と、薬剤処置群はコントロール群と比較して有意に ($P < 0.01$) 腫瘍体積が減少した (図 22)。また、mitoxantrone 群と melphalan + mitoxantrone 群を比較したところ、melphalan + mitoxantrone 群の腫瘍体積は有意に ($P < 0.05$) 減少した (図 22)。これらの結果から melphalan と mitoxantrone を組み合わせたプロトコールは、犬乳腺腫瘍の治療に有用であると考えられた。

[2] 腫瘍の肺転移におよぼす併用の効果

接種部位の腫瘍組織、肺転移病巣について病理組織学的検索を行った。コントロール群では、腫瘍接種部位、肺で腫瘍細胞の増殖像を認められたのに対し、melphalan + mitoxantrone 投与群 (図 23) では、腫瘍接種部位の腫瘍体積が減少し、肺での腫瘍細胞の増殖は認められなかった。また、コントロール群、melpahalan 群、mitoxantrone 群および melphalan + mitoxantrone 群での肺への転移率はそれぞれ 100%、20%、0% および 0% であった。これらの結果から、melphalan の投与により腫瘍の増殖が著しく抑制されるだけでなく肺への転移も抑制されることが分かった (図 23)。

表 11. LAT1 阻害剤併用による抗癌剤の増殖抑制作用の増強

Anti-cancer drugs	Single use	Combination with BCH	Combination with LPM
Carboplatin (μM)	0.47 ± 0.15	0.21 ± 0.02 *	0.18 ± 0.03 *
Cyclophosphamide (mM)	20.3 ± 2.7	8.7 ± 0.81 *	7.8 ± 0.94 *
Doxorubicin (μM)	2.25 ± 0.34	1.14 ± 0.11 *	1.02 ± 0.10 *
Mitoxantrone (μM)	1.28 ± 0.22	0.56 ± 0.05 *	0.50 ± 0.07 *
Vinblastine (μM)	1.14 ± 0.11	0.04 ± 0.01 *	0.03 ± 0.01 *
Vincristine (μM)	1.27 ± 0.14	0.47 ± 0.04 *	0.42 ± 0.03 *

* $P < 0.05$ (vs.single use); BCH, (2-amino-2-norbornane-carboxylic acids); LPM, melphalan.
numbers indicate IC_{50} of each drugs

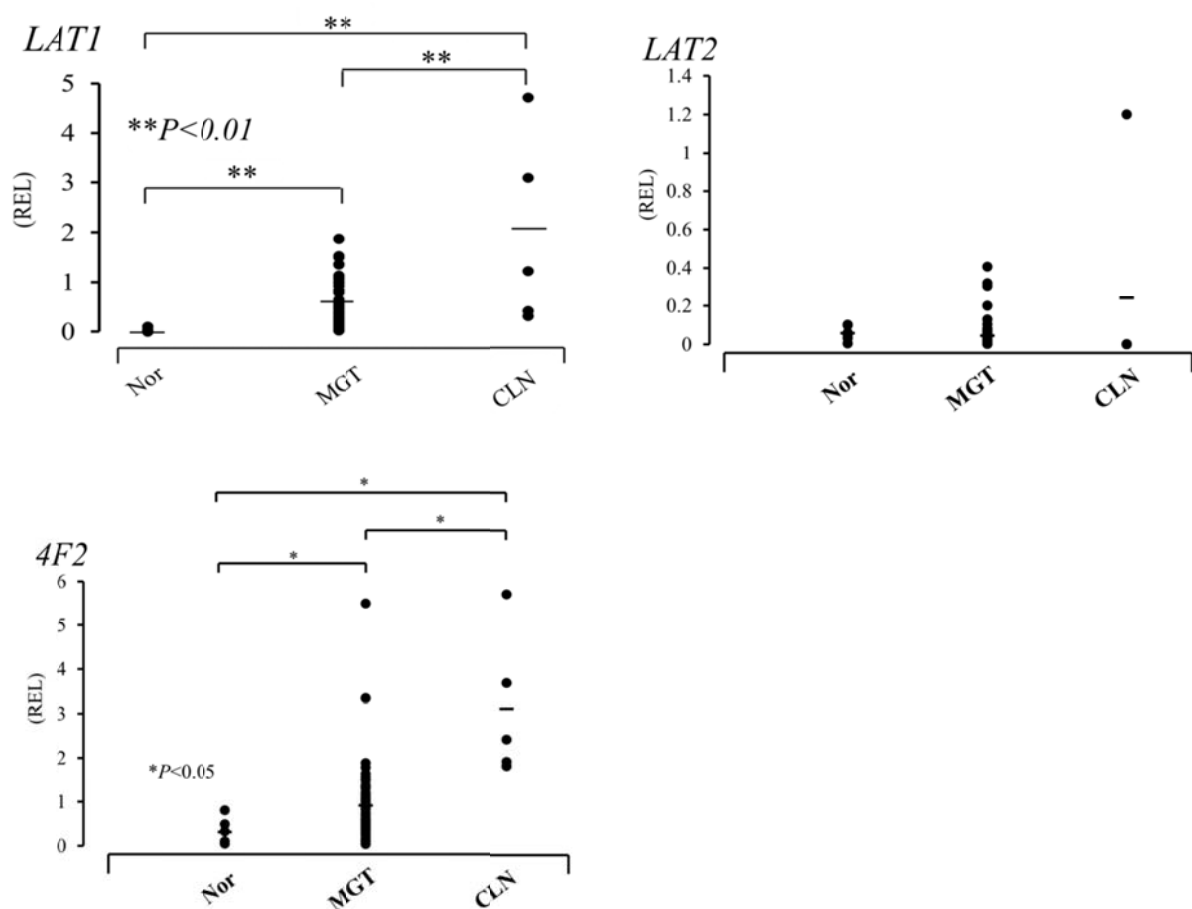


図 18. 犬正常組織、犬乳腺腫瘍組織および株化細胞における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現の比較

犬正常乳腺組織 (Nor)、乳腺腫瘍組織 (MGT) および株化細胞 (CLN) における *LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の発現量を qRT-PCR によって測定した。*LAT1*、*LAT2* および *4F2* mRNA の相対発現量 (REL) は、それぞれ *RP19* mRNA に対する発現量を計算することで求めた。*は、それぞれのグループ間の data に有意差があることをしめす。犬乳腺腫瘍組織および犬乳腺腫瘍由来株化細胞における *LAT1* mRNA の発現量は正常組織と比較して有意 ($P<0.01$) に高値を示した。正常乳腺、犬乳腺腫瘍組織および犬乳腺腫瘍由来株化細胞の *LAT2* mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。犬乳腺腫瘍組織および犬乳腺腫瘍由来株化細胞における *4F2* mRNA の発現量は正常組織と比較して有意 ($P<0.05$) に高値を示した。

●：それぞれの株価細胞、組織における REL, —：REL の平均値

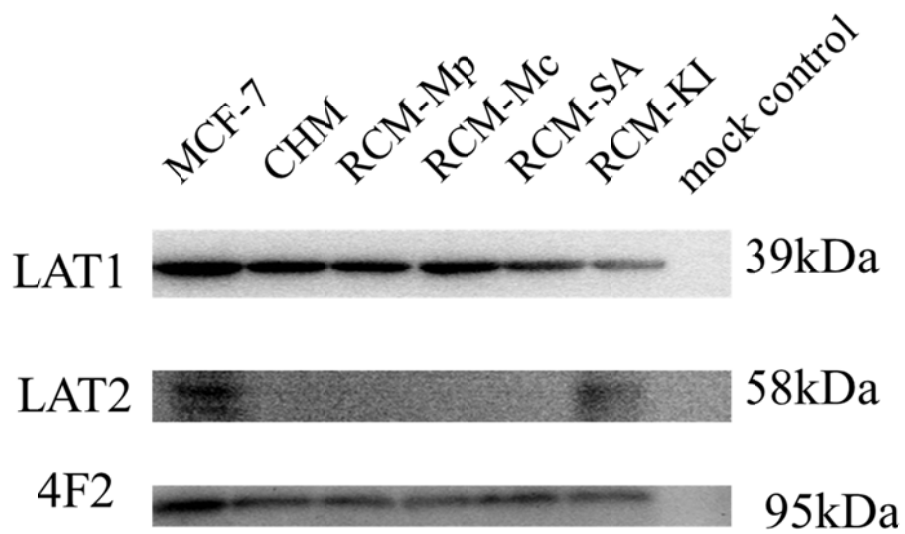


図 19. 犬乳腺腫瘍株化細胞における LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白質の発現

LAT1、LAT2 および 4F2 蛋白質の発現をウェスタンブロットにより検索した。LAT1 および 4F2 蛋白質は全ての株化細胞で発現が認められたが、LAT2 蛋白質の発現は RCM-KI でのみ発現が認められた。MCF-7 は、LAT1、LAT2、および 4F2 のポジティブコントロールとして使用した。

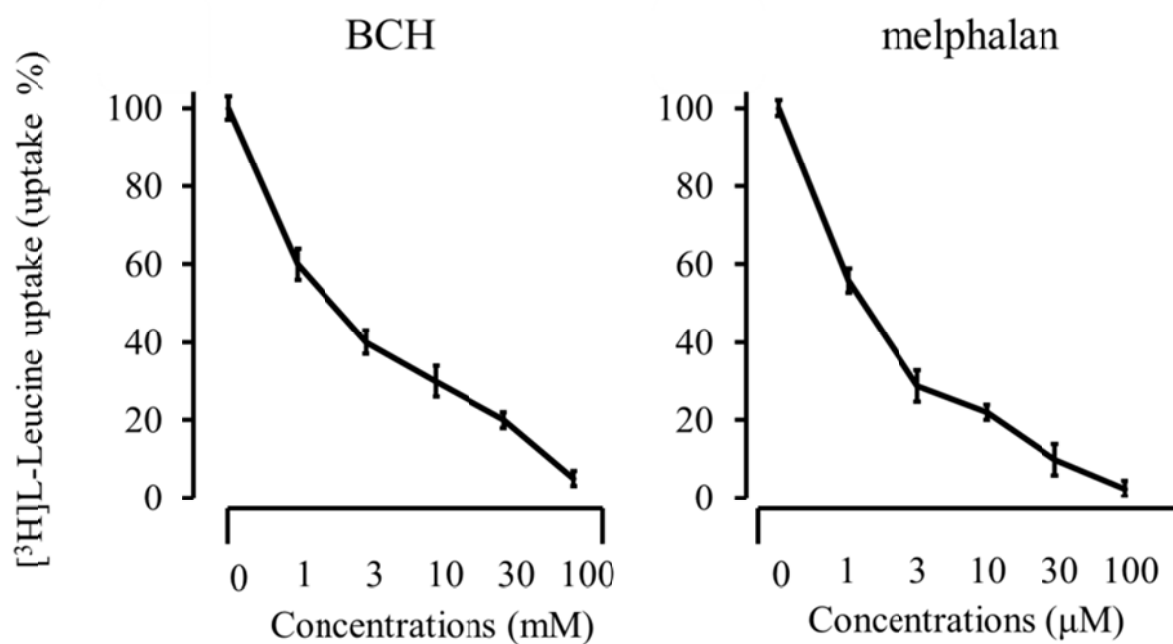


図 20. LAT1 阻害剤による[³H]L-ロイシン取り込み抑制 (CHM-M)

CHM-M での[³H]L-ロイシン (1 μM) の取り込みを各濃度の BCH または melphalan 存在下で検討し濃度と阻害作用との関係を明らかにした。[³H]L-ロイシンの取り込みは、阻害薬の濃度に依存して抑止され、IC₅₀は BCH では $1.6 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 、melphalan では $0.16 \pm 0.05 \mu\text{M}$ であった縦軸は、[³H]L-ロイシン取り込み (%) を阻害剤を添加していない時を 100%として表示した。

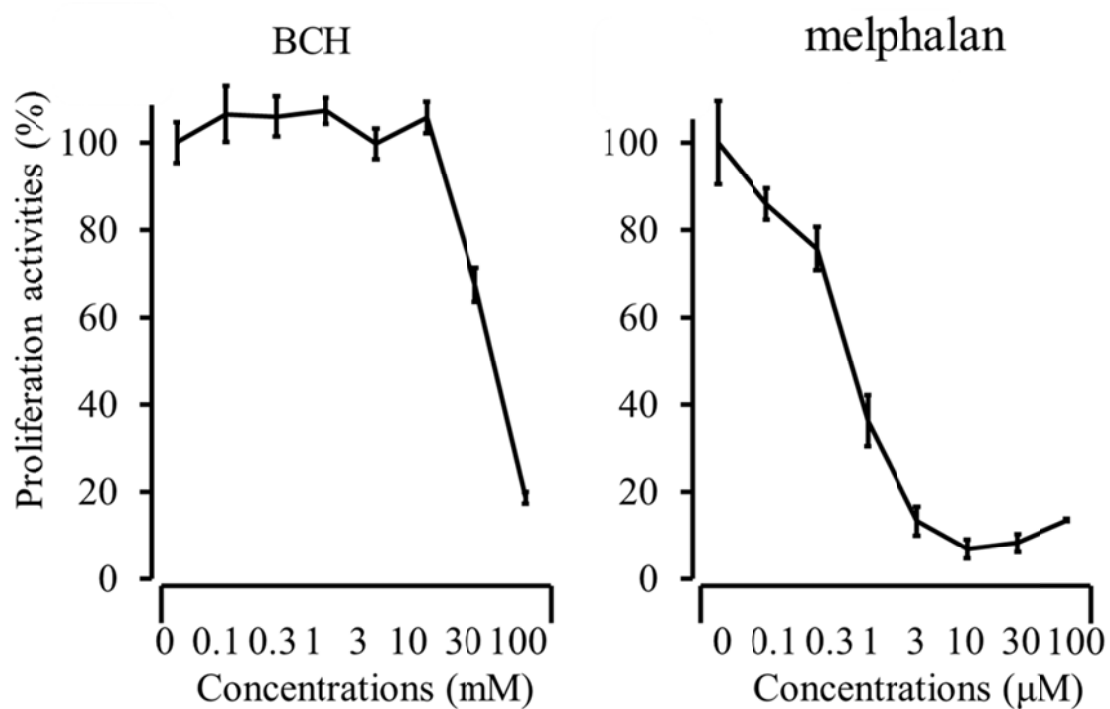


図 21. LAT1 阻害剤による細胞増殖抑制作用 (CHM-M)

CHM-M において、BCH または melphalan による細胞増殖抑制作用を WST-8 アッセイを用いて検討した。阻害剤の濃度に依存し、細胞増殖が抑制され IC_{50} は BCH で 48.2 ± 3.5 mM、melphalan で 18.9 ± 2.3 μM と算出された。増殖活性 (%) は阻害剤を添加していない場合を 100% として示した。

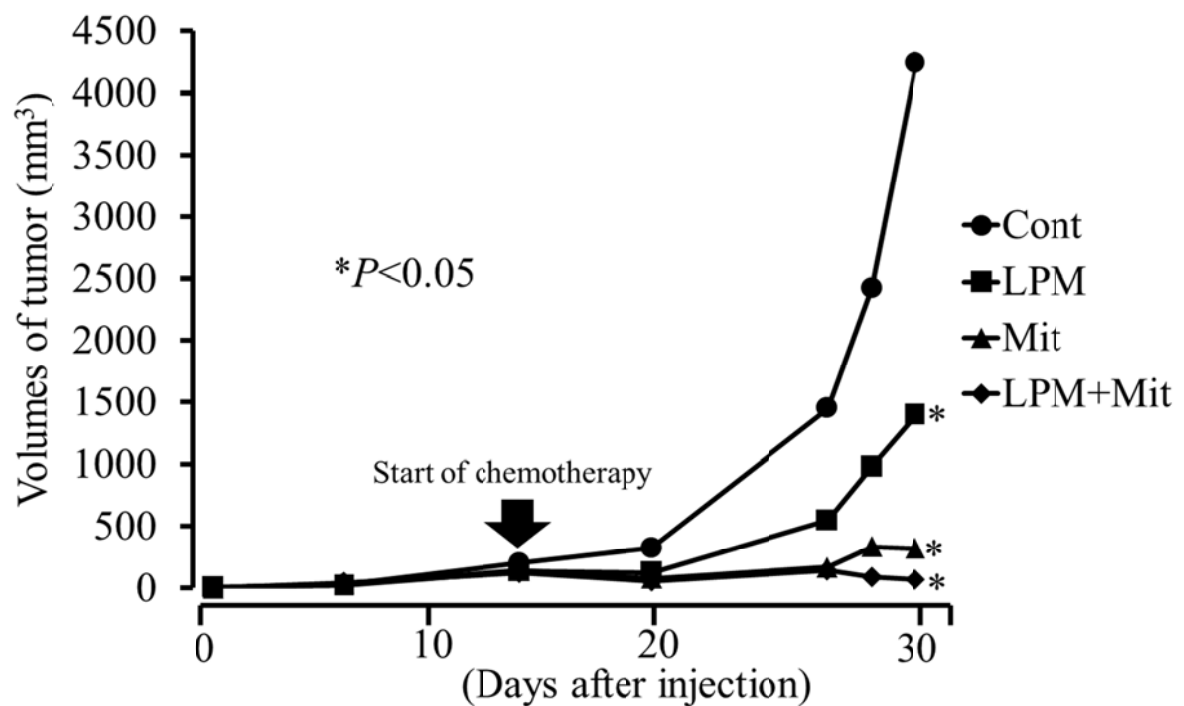


図 22.ヌードマウスに接種した CHM-M の増殖に対する LAT1 阻害剤の効果

LAT1 阻害剤の *in vivo* における効果を検討するために、ヌードマウスの右臀部に CHM-M を 5×10^6 細胞接種し、平均腫瘍体積が 100 mm^3 に達した時点 (CHM-M 接種後 14 日目) より、melpahlan および mitoxantrone の投与を開始した。コントロール群 (Cont)、melpahlan 投与群 (LPM)、mitoxantrone 投与群 (Mit)、melpahlan および mitoxantrone 投与群 (LPM+Mit) の腫瘍体積の推移をしている。

*は、コントロール群と比較して LPM 群、Mit 群および LPM+Mit 群では腫瘍体積が有意 ($P < 0.05$) に減少していることを示している。

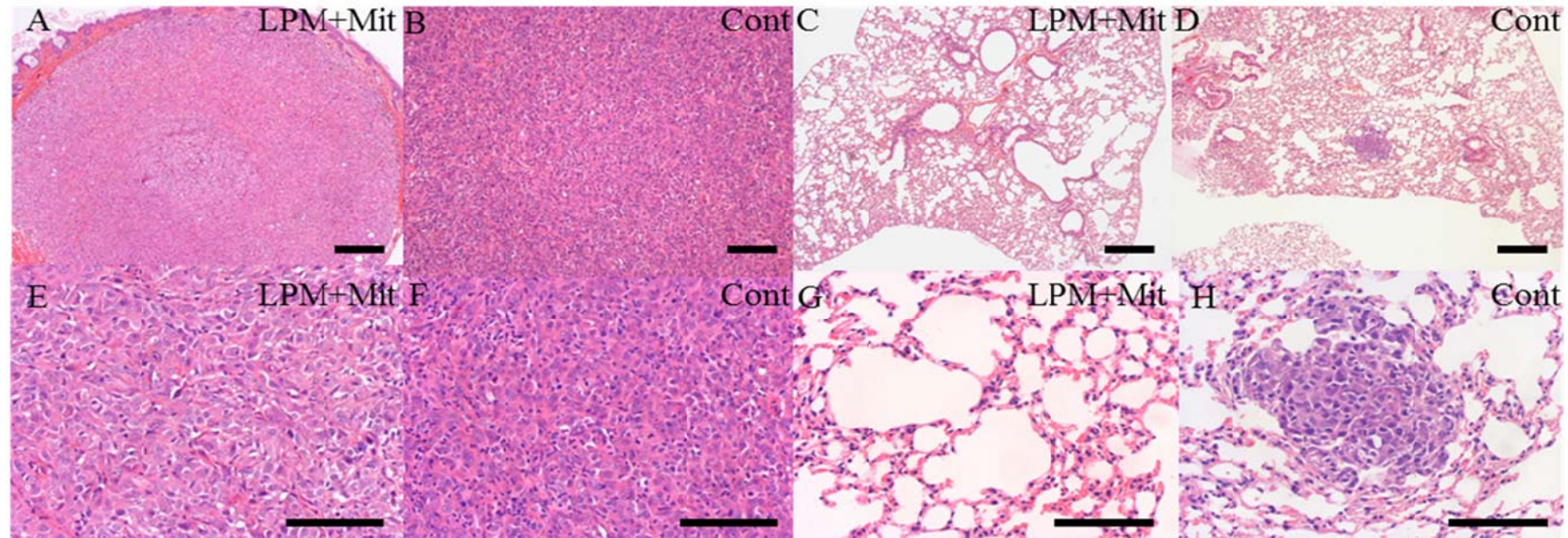


図 23. ノードマウスに接種した CHM-M の病理組織像

腫瘍接種部位および肺におけるコントロール (Cont) 群および melphalan+ mitoxantrone (LPM+Mit) 群における HE 像を示す。Cont 群で肺において腫瘍細胞の増殖が認められたが、LPM+Mit 群では肺での腫瘍細胞の増殖は認められなかった。

A、B、E および F は、腫瘍接種部位の HE 像であり、C、D、G および H は肺での HE 像である。A、C、E および G は、LPM+Mit 群であり、B、D、F、H は、Cont 群である。

スケールバーはそれぞれ A、B、C および D で 200 μ m 、E、F、G および H で 50 μ m を示す。

4. 考察

人の様々な腫瘍組織および腫瘍細胞における LAT1 の発現に関する研究が行われ LAT1 の発現量が正常組織と比較し増加していることから、LAT1 は腫瘍細胞の増殖において重要な役割を果たしているのではないかと考えられている[21, 39, 58, 68]。本研究の結果から、犬乳腺腫瘍由来株化細胞において LAT1 蛋白質の発現が確認され、LAT1 mRNA の発現量が人の様々な腫瘍と同様に正常組織と比較し増加していることが明らかになった。一方で、人の様々な腫瘍では LAT2 の発現に関する研究もなされている[41, 65, 75]。それらの報告では LAT2 の発現量が正常組織と比較して低下していることから、LAT2 は腫瘍細胞の増殖において重要な役割を果たしていないのではないかと推察されている[41, 65, 75]。本研究でも LAT2 蛋白質の発現が 5 種類の株化細胞中 1 種類の株化細胞でしか認められなかった。また、LAT2 mRNA の発現量は正常な乳腺組織と比較して乳腺腫瘍組織や 5 種類の株化細胞を除く一つの株化細胞で著しく低下していた。これらのことをまとめて考えると、犬の腫瘍においても LAT1 が腫瘍の増殖において重要な役割を果たしているのではないかと推察できた。腫瘍細胞で LAT2 の発現が低下する理由は今回の実験からは明らかにすることができなかったが、LAT1 の発現増加により LAT2 の機能的な意味が減弱し低下したとも推察できる。

人乳癌は、最も発生頻度が高い腫瘍の一つであり、日本人女性の 16 人に 1 人、欧米人では 8 人に 1 人が生涯に罹患すると言われている[7, 63]。人乳癌の 30 %で遠隔転移を伴うことが報告されており[12]、早期診断および早期治療が重要であるとされ、早期の外科的手術および術後の様々な抗癌剤を組み合わせた多剤併用化学療法を合わせて実施することで治療成績が改善されてきた[23, 89]。しかしながら、未だに 50~60%の人乳癌は化学療法に反応しないと報告されていることから新たな治療のターゲットの検索が行われている[15, 48]。Shennan らは、人乳癌由来株化細胞 MCF-7 および MDA-MB 231 に、LAT1 阻害剤である BCH や melphalan を投与し細胞増殖が抑制されたことを報告している[74]。このことは、LAT1 阻害剤は人乳癌の新たな治療のターゲットとして有望であることを示している

一方で、犬乳腺腫瘍は、腫瘍の挙動および病理組織学形態が類似していることや犬での発生率が高いことから人乳癌の自然発生モデルであると考えられている[43, 54]。本研究において、犬乳腺腫瘍由来株化細胞に対して直接 LAT1 阻害剤を投与し細胞増

殖が用量依存性に抑制されることが分かった。また、犬乳腺腫瘍由来株化細胞をヌードマウスに接種し、ヌードマウスに LAT1 阻害剤および mitoxantrone を投与する実験から、LAT1 阻害剤単剤により肺への転移が抑制されることや LAT1 阻害剤と mitoxantrone を組みわせることで、mitoxantrone 単剤で使用する場合と比較し接種した株化細胞の腫瘍体積が有意に減少することがわかった。これらの結果を総合的に判断すると、LAT1 阻害剤を含む化学療薬の処置プロトコールは、犬乳腺腫瘍の治療に対して有効と推察された。また、人乳癌においては、10~20%の割合でエストロゲンホルモンレセプター、プロゲステロンホルモンレセプターおよび HER2 が発現しないトリプルネガティブの乳癌が報告されている[83]。このトリプルネガティブの乳癌は、腫瘍細胞にホルモンレセプターの発現が認められる際に使用される Tamoxifen やアロマターゼ阻害薬や HER2 の発現が認められる際に使用される Trastuzumab による治療に反応しないことから、乳癌の中でも特に予後が悪いと考えられている[83]。これらのトリプルネガティブな乳癌において LAT1 が高率で発現することから[21]、LAT1 阻害剤を含む治療プロトコールがこのようなタイプの乳癌に有効である可能性が本研究の成果から示唆される。今後、人のトリプルネガティブ乳癌が LAT1 の阻害薬の適応になるかもしれない。

LAT1 阻害剤を用いたアミノ酸取り込み実験の結果から算出された IC_{50} は BCH および melphalan でそれぞれ、 $1.6 \pm 0.05 \mu M$ 、 $0.16 \pm 0.05 \mu M$ であった。それに対し、LAT1 阻害剤を用いた細胞増殖抑制実験の結果から算出された IC_{50} は BCH および melphalan でそれぞれ $48.2 \pm 3.5 mM$ および $18.9 \pm 2.3 \mu M$ であり、両者の IC_{50} の間に大きな差が認められた。このような大きな差異が出現した理由は定かではないが、アミノ酸取り込み実験で用いた溶液の組成と細胞培養に用いた培地の組成に大きな違いが認められること（第4章方法参照）、これまでの報告を元[39, 74, 94]に LAT1 阻害薬との反応時間をアミノ酸取り込み実験では 1 分、増殖抑制試験に関しては 48 時間に設定していることなどが考えられる。

本研究で得られた両薬物の細胞増殖抑制試験の IC_{50} とアミノ酸取り込み実験の IC_{50} を比較してみると BHC では約 30,000 倍、melphalan では約 100 倍高く、 IC_{50} の比率には約 300 倍の差が生じていた。この差は、BCH と melphalan の薬剤としての性質の違いに起因するのではないかと推察する。BCH は、LAT1 を阻害するだけでなく LAT2

も阻害すると報告されている[39, 85, 92]。しかしながら、本研究で使用した犬乳腺腫瘍由来株化細胞 CHM-M は、LAT2 蛋白質の発現が認められていないことから細胞増殖抑制効果は LAT1 が阻害されたことによる。一方で、melphalan は LAT1 と LAT2 では LAT1 の選択性が高い LAT1 阻害剤と報告されているが、アルキル化剤であることも知られている[24]。この melphalan が抗腫瘍効果を示すためには、薬物が腫瘍細胞内に取り込まれ核に到達したのち、アルキル基を付与して、二本鎖 DNA をらせん状にねじれた異常な形で結合させ DNA のコピーが出来ないようにして抗腫瘍効果を得ている。LAT1 および 4F2 がダウンレギュレーションしている腫瘍細胞では melphalan に対し耐性を生じることから、腫瘍細胞に melphalan が取り込まれる際に利用されるトランスポーターが LAT1 と考えられている[24]。すなわち、melphalan による細胞増殖抑制は LAT1 を阻害することで腫瘍細胞が増殖に必要なアミノ酸の取り込みが抑制され、さらにアルキル化剤としても作用することでより強い腫瘍細胞増殖抑制効果を得ている。この作用機序の差が BHC との差に反映されていると推察される。

5. 小括

本章では、犬乳腺腫瘍由来株化細胞を機能解析することで

- 1) 犬乳腺腫瘍由来株化細胞における LAT1 および 4F2 mRNA の発現量は、正常乳腺組織と比較して発現量が増加していた。様々な犬乳腺腫瘍由来株化細胞(CHM-M、RCM-KI、RCM-SA、RCM-Mc、RCM-Mp) において LAT1 および 4F2 の発現が認められたが、LAT2 の発現は一つの株化細胞 (RCM-KI) でのみでしか認められなかった。
- 2) CHM-M では、LAT1 阻害剤(BHC, melphalan)により用量依存性にアミノ酸の取り込みおよび細胞増殖が抑制された。
- 3) LAT1 阻害剤は、様々な抗癌剤 (Carbplatin, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Mitoxantrone, Vinblastine, Vincristine) の腫瘍増殖抑制効果を増強した。
- 4) ノードマウスに移植した乳腺腫瘍の増殖と肺への転移は、LAT1 阻害剤 (melphalan) を含む投与プロトコールにより抑制された。また、LAT1 阻害薬は mitoxantrone の抗腫瘍作用を増大させた。

以上の結果より、犬乳腺腫瘍の治療に LAT1 阻害剤を含む投与治療プロトコールが有効である可能性が考えられた。

総括

抗癌剤による腫瘍の治療は、副作用の多い殺細胞型の薬から、腫瘍細胞に特異的に発現する分子(蛋白質)をターゲットした分子標的治療薬に推移して流れにある。このような分子は、癌の診断にも有用性が高い。本研究は、犬腫瘍の新たな腫瘍の診断マーカーおよび治療のターゲットとしてアミノ酸トランスポーターの LAT1 に注目しその有用性について検討した初めての報告である。

第 I 章では、犬の腫瘍組織での LAT1、LAT2 および 4F2 の発現と比較することを目的に犬の正常組織における LAT1、LAT2 および 4F2 の発現を検索した。正常組織で LAT1 は、精巣、脳の限られた部位でのみ発現していた。一方、LAT2 は、多くの組織(精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎および腎臓)で発現が認められた。4F2 も、多くの正常組織(精巣、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、前立腺、副腎、腎臓、卵巣、子宮および乳腺)で発現が認められた。以上より人での報告と同様に犬においても、LAT1 は限られた正常組織でのみ発現していること、LAT2 や 4F2 は多くの正常組織で発現していることが明らかになった。

第 II 章では、様々な犬の腫瘍組織における LAT1、LAT2 および 4F2 の発現を検索し、LAT1 の腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。LAT1 は、多くの腫瘍(乳腺腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝、細胞癌および肛門嚢腺癌)において発現が認められ、量的にも正常組織と比較して有意に高値を示した。LAT1 mRNA の発現量に基づく腫瘍の診断は感度、特異度、正診率に優れていた。また、犬乳腺腫瘍および犬悪性黒色腫において LAT1 mRNA の発現量は予後因子の一つと成り得ると考えられた。LAT2 も様々な腫瘍細胞に発現していたが、発現量は正常組織と比較し低下または変化がなかった。4F2 は LAT1 と同様に、多くの腫瘍(乳腺腫瘍、線維肉腫、悪性黒色腫、血管肉腫、膀胱移行上皮癌、肥満細胞腫、骨肉腫、精巣腫瘍、肺腺癌、肝細胞癌および肛門嚢腺癌)において発現増加が認められた。様々な犬の腫瘍において LAT1 mRNA と 4F2 mRNA の発現を比較したところ両者の間には強い正の相関を認めた。以上より犬の様々な腫瘍組織において LAT1 mRNA の発現量は犬腫瘍の診断マーカーおよび予後因子の一つとして有用であることがわかった。

第 III 章では、LAT1 が犬乳腺腫瘍の新たな治療のターゲットとして有用であるかを

検討した。その結果、LAT1 阻害剤（BHC、melphalan）がアミノ酸取り込みおよび細胞増殖を用量依存性に抑制すること、併用により様々な抗癌剤の腫瘍増殖抑制効果を増強することを *in vitro* で明らかにした。ヌードマウスを用いて *in vivo* で LAT1 阻害剤を含む投与プロコールを検討したところ、移植腫瘍の体積は mitoxantrone 単独で投与した場合と比較して、melphalan（LAT1 阻害剤）を同時に投与することで有意に減少することがわかった。また、併用により腫瘍の肺への転移も強く抑制された。以上のことから犬乳腺腫瘍の治療において、LAT1 の阻害剤を含む治療プロトコールは有用である可能性が考えられた。

以上より、LAT1 は犬腫瘍細胞に高頻度、高濃度に発現し腫瘍増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。基礎的な検討からこの分子をターゲットした診断および治療が有用であることが示唆されたので、今後、獣医臨床分野での応用を進めていく必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご親切な指導および論文の校閲をいただきました本学獣医学群伴侶動物医療学分野、獣医内科学ユニット打出毅教授に深く感謝致します。

また、本論文のご校閲をいただきました本学獣医学群伴侶動物医療学分野、獣医外科学ユニット廉澤剛教授、生体機能学分野・獣医生化学ユニット横田博教授、獣医学群、獣医保健看護学類、動物看護学ユニット 北澤多喜雄教授に深く感謝致します。

本研究の実施にあたり、ご親切な指導と助言をいただきました本学獣医学群生体機能学分野、獣医生化学ユニット 岩野英知准教授、本学獣医学群生体機能学分野、獣医放射線生物学ユニット林正信教授および遠藤大二教授、本学獣医学群感染・病理学分野 獣医病理学ユニット平山和子先生および溝奥尋子先生、実験検体のご提供をいただきました開業動物病院の先生方、本学獣医学群伴侶動物医療学分野、獣医外科学ユニット遠藤能史助教、北里大学獣医学研究科小動物第二内科教室堀泰智講師、北海道大学獣医学研究科獣医外科学教室奥村正裕教授、高木 哲准教授ならびに細谷謙次助教に深く感謝致します。

また、本研究に多大なご協力をいただきました本学伴侶動物医療学分野の皆さまに深く感謝致します。

引用文献

1. Abraham, J. A., Hornicek, F. J., Kaufman, A. M., Harmon, D. C., Springfield, D. S., Raskin, K. A., Mankin, H. J., Kirsch, D. G., Rosenberg, A. E., Nielsen, G. P., Deshpande, V., Suit, H. D., DeLaney, T. F. and Yoon S. S. 2007. Treatment and outcome of 82 patients with angiosarcoma. *Ann. Sur. Onc.* **14**:1953-1967.
2. Alvarez, F. J., Hosoya, K., Lara-Garcia, A., Kisseberth, W. and Couto, G. 2013. VAC Protocol for Treatment of Dogs with Stage III Hemangiosarcoma. *J. Amer Ani Hos Asso.* **in press**.
3. Ballegeer, E. A., Hollinger, C. and Kunst, C. M. 2013. Imaging diagnosis-multicentric lymphoma of granular lymphocytes imaged with FDG PET/CT in a dog. *Vet radio ultra.* **54**:75-80.
4. Baumann , D., Hauser, B., Hubler, M. and Fluckiger, M. 2004. Signs of metastatic disease on thoracic radiographs of dogs suffering from mammary gland tumours: a retrospective study (1990-1998). *Schwe Archiv fur Tier.* **146**:431-435.
5. Bergman, P.J. 2007. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* **22**:55-60.
6. Best, M. P. and Fry, D. R. 2013. Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in dogs receiving cyclophosphamide orally for three days without concurrent furosemide as part of a chemotherapeutic treatment for lymphoma: 57 cases (2007-2012). *J Ame Vet Med Ass.* **243**:1025-1029.
7. Biesheuvel, C., Weigel, S. and Heindel, W. 2011. Mammography Screening: Evidence, History and Current Practice in Germany and Other European Countries. *Breast care (Basel, Switzerland).* **6**:104-109.
8. Bokhorst, L. P., Bangma, C. H., van Leenders, G. J., Lous, J. J., Moss, S. M., Schroder, F. H. and Roobol, M. J. 2013. Prostate-specific Antigen-Based Prostate Cancer Screening:

Reduction of Prostate Cancer Mortality After Correction for Nonattendance and Contamination in the Rotterdam Section of the European Randomized Study of Screening for Prostate. *Can Euro uro*. **In press**.

9. Boll, B., Bredenfeld, H., Gorgen, H., Halbsguth, T., Eich, H. T., Soekler, M., Markova, J., Keller, U., Graeven, U., Kremers, S., Geissler, M., Trenn, G., Fuchs, M., von Tresckow, B., Eichenauer, D. A., Borchmann, P. and Engert, A. 2011. Phase 2 study of PVAG (prednisone, vinblastine, doxorubicin, gemcitabine) in elderly patients with early unfavorable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Blood*. **118**: 6292-6298.

10. Bossa, R., Galatulas, I. and Mantovani, E. 1977. Cardio-toxicity of Daunomycin and Adriamycin. *Neoplasma*. **24**:405-409.

11. Bronson, R. T. 1982. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Ame J vet res*. **43**:2057-2059.

12. Cybulska-Stopa, B., Ziobro, M., Skoczek, M., Kojs-Pasinska, E., Cedrych, I. and Brandys, A. 2013. Evaluation of vinorelbine-based chemotherapy as the second or further-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*. **17**:78-82.

13. De Bruyne, S., Van Damme, N., Smeets, P., Ferdinande, L., Ceelen, W., Mertens, J., Van de Wiele, C., Troisi, R., Libbrecht, L., Laurent, S., Geboes, K. and Peeters, M. 2012. Value of DCE-MRI and FDG-PET/CT in the prediction of response to preoperative chemotherapy with bevacizumab for colorectal liver metastases. *Bri J Can*. **106**:1926-1933.

14. del Amo, E. M., Urtti, A. and Yliperttula, M. 2008. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci*. **35**:161-174.

15. Dittrich, C., Solska, E., Manikhas, A., Eniu, A., Tjulandin, S., Anghel, R., Musib, L., Frimodt-Moller, B., Liu, Y., Krejcy, K. and Lang, I. 2012. A phase II multicenter study of two different dosages of pemetrexed given in combination with cyclophosphamide as first-line

treatment in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Can Inve.* **30**:309-316.

16. Esteban, J. M., Felder, B., Ahn, C., Simpson, J. F., Battifora, H. and Shively, J.E. 1994. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer.* **74**:1575-1583.

17. Fan, X., Ross, D.D., Arakawa, H., Ganapathy, V., Tamai, I. and Nakanishi, T. 2010. Impact of system L amino acid transporter 1 (LAT1) on proliferation of human ovarian cancer cells: a possible target for combination therapy with anti-proliferative aminopeptidase inhibitors. *Bio Phar.* **80**:811-818.

18. Fesler, M. J., Osman, M., Glauber, J. and Petruska, P. J. 2011. C-MOPP: the forgotten regimen plus Rituximab for untreated and relapsed follicular lymphoma. *Ame J blo res.* **1**:204-214.

19. Frazier, S. A., Johns, S. M., Ortega, J, Zwingenberger, A. L., Kent, M. S., Hammond, G. M., Rodriguez, C. O., Steffey, M. A. and Skorupski, K. A. 2012. Outcome in dogs with surgically resected oral fibrosarcoma (1997-2008). *Vet com onc.* **10**:33-43.

20. Fukumoto, S., Hanazono, K., Fu, D. R., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T. 2013. A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): A pilot study in a canine model. *Bio bio res com.* **439**:103-108.

21. Furuya, M., Horiguchi, J., Nakajima, H., Kanai, Y. and Oyama, T. 2012. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer science.* **103**:382-389.

22. Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A.I. and Black, M. M. 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet path.* **20**:127-142.

23. Gradishar, W. J., Kaklamani, V., Sahoo, T. P., Lokanatha, D., Raina, V., Bondarde, S., Jain,

- M., Ro, S. K., Lokker, N. A. and Schwartzberg, L. 2013. A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b study evaluating sorafenib in combination with paclitaxel as a first-line therapy in patients with HER2-negative advanced breast cancer. *Eur J Can.* **49**:312-322.
24. Harada, N., Nagasaki, A., Hata, H., Matsuzaki, H., Matsuno, F. and Mitsuya, H. 2000. Down-regulation of CD98 in melphalan-resistant myeloma cells with reduced drug uptake. *Acta haematologica.* **103**:144-151.
25. Herold-Mende, C., Steiner, H. H., Andl, T., Riede, D., Buttler, A., Reisser, C., Fusenig, N.E. and Mueller, M.M. 1999. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Inve; J Tec Met Pat.* **79**:1573-1582.
26. Ichinoe, M., Mikami, T., Yoshida, T., Igawa, I., Tsuruta, T., Nakada, N., Anzai, N., Suzuki, Y., Endou, H and Okayasu, I. 2011. High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pat Inter.* **61**:281-289.
27. Ikotun, O. F., Marquez, B. V., Huang, C., Masuko, K., Daiji, M., Masuko, T., McConathy, J. and Lapi, S. E. 2013. Imaging the L-Type Amino Acid Transporter-1 (LAT1) with Zr-89. *ImmunoPET PloS.* **In press.**
28. Im, K. S., Kim, N. H., Lim, H. Y., Kim, H. W., Shin, J.I. and Sur, J.H.2013. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Vet Path.***In press.**
29. Imai, H., Kaira, K., Oriuchi, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Yanagitani, N., Sunaga, N., Ishizuka, T., Nagamori, S., Promchan, K., Nakajima, T., Yamamoto, N., Mori, M and Kanai, Y. 2010. Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anti Res.* **30**:4819-4828.
30. Imamura, M., Inoue, K., Megumi, Y., Nishimura, M., Ohmori, K. and Nishimura, K. 2000. [Clinical evaluation of urinary basic fetoprotein and the BTA test for detection of bladder

cancer] *Hin ki. Acta urol Jap.* **46**:705-709.

31. Inoue, K., Ohashi, E., Kadosawa, T., Hong, S. H., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R. and Sasaki, N. 2004. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. *J vet med sci.* **66**:1437-1440.

32. Jadvar, H., Desai, B., Ji, L., Conti, P. S., Dorff, T. B., Groshen, S. G., Gross, M. E., Pinski, J. K. and Quinn, D. I. 2012. Prospective evaluation of 18F-NaF and 18F-FDG PET/CT in detection of occult metastatic disease in biochemical recurrence of prostate cancer. *Clin Nuc Med.* **37**:637-643.

33. Jia, W., Gao, X. J., Zhang, Z. D., Yang, Z. X. and Zhang, G. 2013. S100A4 silencing suppresses proliferation, angiogenesis and invasion of thyroid cancer cells through downregulation of MMP-9 and VEGF. *Eu rev medi pha sci.* **17**:1495-1508.

34. Kageyama, T., Imura, T., Matsuo, A., Minato, N. and Shimohama, S. 2000. Distribution of the 4F2 light chain, LAT1, in the mouse brain. *Neuroreport.* **11**:3663-3666.

35. Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T. and Mori, M. 2008. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Bri J can.* **98**:742-748.

36. Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. and Endou, H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem.* **273**:23629-23632.

37. Kaneko, Y., Imoto, S. and Kasakura, S. 1995. [Study for clinical usefulness of CEA, TPA, CA15-3 and BCA225 in breast cancer]. *Rinsho byori. Jap J clin path.* **43**:696-702.

38. Kim, C. S., Moon, I. S., Park, J.H., Shin, W. C., Chun, H. S., Lee, S.Y., Kook, J. K., Kim, H. J., Park, J. C., Endou, H., Kanai, Y., Lee, B. K. and Kim do, K. 2010. Inhibition of L-type

amino acid transporter modulates the expression of cell cycle regulatory factors in KB oral cancer cells. *Biol Pharm Bull.* **33**:1117-1121.

39. Kim, D. K., Kanai, Y., Choi, H. W., Tangtrongsup, S., Chairoungdua, A., Babu, E., Tachampa, K., Anzai, N., Iribe, Y. and Endou, H. 2002. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Bioc bio acta.* **1565**:112-121.

40. Kim, M., Higuchi, T., Arisaka, Y., Achmad, A., Tokue, A., Tominaga, H., Miyashita, G., Miyazaki, H., Negishi, A., Yokoo, S. and Tsushima, Y. 2013. Clinical significance of (1)(8)F-alpha-methyl tyrosine PET/CT for the detection of bone marrow invasion in patients with oral squamous cell carcinoma: comparison with (1)(8)F-FDG PET/CT and MRI. *An nuc med.* **27**:423-430.

41. Kim, S. G., Kim, H. H., Kim, H. K., Kim, C. H, Chun, H. S., Kanai, Y., Endou, H. and Kim do, K. 2006. Differential expression and functional characterization of system L amino acid transporters in human normal osteoblast cells and osteogenic sarcoma cells. *Anti res.* **26**:1989-1996.

42. Kobayashi, M., Sugisaki, O., Ishii, N., Yamada, O., Ito, K., Kuroki, S., Sasaki, Y., Ono, K., Washizu, T. and Bonkobara, M. 2012. Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. *Vet J.* **193**:264-267.

43. Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. and Nagini, S. 2006. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res vet sci.* **81**:218-224.

44. Lawrence, J., Rohren, E. and Provenzale, J. 2010. PET/CT today and tomorrow in veterinary cancer diagnosis and monitoring: fundamentals, early results and future perspectives. *Vet com onc.* **8**:163-187.

45. Lee, S., Lee, C. Y., Kim, D. J., Hong, D. J., Lee, J. G. and Chung, K.Y. 2013. Pathologic correlation of serum carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 fragment in resected

nonsmall cell lung cancer. *Kor J tho card sur.* **46**:192-196.

46. Lerman, H., Bar-On, S., Helpman, L., Even-Sapir, E. and Grisaru, D. 2012. Estrogen-dependent variations in 18F-fluorodeoxyglucose uptake in uterine leiomyomas. *Intl J gyn can.* **22**:1187-1191.
47. Lewerenz, J., Klein, M. and Methner, A. 2006. Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc- protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neu.* **98**:916-925.
48. Martin, M., Makhson, A., Gligorov, J., Lichinitser, M., Lluch, A., Semiglazov, V., Scotto, N., Mitchell, L and Tjulandin, S. 2012. Phase II study of bevacizumab in combination with trastuzumab and capecitabine as first-line treatment for HER-2-positive locally recurrent or metastatic breast cancer. *The oncologist.* **17**:469-475.
49. McGivan, J. D. and Pastor-Anglada, M. 1994. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J.* **299** :321-334.
50. Member, B., Helson, L., Helson, C., Erlandson, R. and Hajdu, S. I. 1985. Human meningeal sarcoma heterotransplants in Nu/Nu mice treated with L-phenylalanine mustard (L-PAM) and dianhydrogalactitol (DAG) . *Anti res.* **5**:559-564.
51. Miyajima, N., Watanabe, M., Ohashi, E., Mochizuki, M., Nishimura, R., Ogawa, H., Sugano, S. and Sasaki, N. 2006. Relationship between retinoic acid receptor alpha gene expression and growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid on canine tumor cells. *J vet int med.* **20**:348-354.
52. Morimoto, M., Numata, K., Nozaki, A., Kondo, M., Moriya, S., Taguri, M., Morita, S., Konno, M., Sugo, A., Miyajima, E., Maeda, S. and Tanaka, K. 2012. Novel Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein: a biomarker of hepatocellular carcinoma recurrence in patients with low alpha-fetoprotein concentrations. *Int J clin onc.* **17**:373-379.

53. Morris, P. G., Iyengar, N. M., Patil, S., Chen, C., Abbruzzi, A., Lehman, R., Steingart, R., Oeffinger, K. C., Lin, N., Moy, B., Come, S. E., Winer, E. P., Norton, L., Hudis, C. A. and Dang, C. T. 2013. Long-term cardiac safety and outcomes of dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel and trastuzumab with and without lapatinib in patients with early breast cancer .*Cancer*. **In press**.

54. Mottolese, M., Morelli, L., Agrimi, U., Benevolo, M., Sciarretta, F., Antonucci, G. and Natali, P. G. 1994. Spontaneous canine mammary tumors. A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer Laboratory investigation. *J tech meth path*. **71**:182-187.

55. Nakada, N., Mikami, T., Hana, K., Ichinoe, M., Yanagisawa, N., Yoshida, T., Endou, H. and Okayasu, I. 2013. Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. *Histo hist*. **In press**.

56. Nakamura, N., Momoi, Y., Watari, T., Yoshino, T., Tsujimoto, H. and Hasegawa, A. 1997. Plasma thymidine kinase activity in dogs with lymphoma and leukemia. *J vet med sci*. **59**:957-960.

57. Nakanishi, K., Matsuo, H., Kanai, Y., Endou, H., Hiroi, S., Tominaga, S., Mukai, M., Ikeda, E., Ozeki, Y., Aida, S. and Kawai, T. 2006. LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch*. **448**:142-150.

58. Nawashiro, H., Otani, N., Shinomiya, N., Fukui, S., Ooigawa, H., Shima, K., Matsuo, H., Kanai, Y. and Endou, H. 2006. L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int J Cancer*. **119**:484-492.

59. Nemec, A., Murphy, B. G., Jordan, R. C., Kass, P. H. and Verstraete, F. J. 2013. Oral Papillary Squamous Cell Carcinoma in Twelve Dogs. *J com path*. **In press**.

60. Nobusawa, A., Kim, M., Kaira, K., Miyashita, G., Negishi, A., Oriuchi, N., Higuchi, T.,

Tsushima, Y., Kanai, Y., Yokoo, S. and Oyama, T.2013. Diagnostic usefulness of (18)F-FAMT PET and L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Eur j nuc med mol ima.* **40**:1692-1700.

61. Oda, K., Hosoda, N., Endo, H., Saito, K., Tsujihara, K., Yamamura, M., Sakata, T., Anzai, N., Wempe, M. F., Kanai, Y. and Endou, H. 2010. L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer science.* **101**:173-179.

62. Ohkame, H., Masuda, H., Ishii, Y and Kanai, Y. 2001. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol.* **78**:265-271

63. Ohsumi, S. and Shimosuma, K.2013. Current status and future perspectives of patient-reported outcome research in clinical trials for patients with breast cancer in Japan. *Breast cancer.* **20**:296-301.

64. Osman, A. M., Bayoumi, H. M., Al-Harthi, S. E., Damanhour, Z. A, Elshal, M. F. 2012. Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line. *Can cell int.* **12**:47-49.

65. Park ,N. S, Kim, S. G., Kim, H. K., Moon, S. Y., Kim, C. S., Cho, S. H., Kanai, Y., Endou, H. and Kim do, K. 2008.Characterization of amino acid transport system L in HTB-41 human salivary gland epidermoid carcinoma cells. *Anti res.* **28**:2649-2655.

66. Pinto, V., Pinho, M. J. and Soares-da-Silva, P. 2013. Renal amino acid transport systems and essential hypertension. *FASEB J.* **27**:2927-2938.

67. Rebiere M, Verburg FA, Palmowski M, Krohn T, Pietsch H, Kuhl CK, Mottaghy FM, Behrendt FF (2012) Multiphase CT scanning and different intravenous contrast media concentrations in combined F-18-FDG PET/CT: Effect on quantitative and clinical assessment. *Eur J rad.* **81**:862-869.

68. Ring, B. Z., Seitz, R. S., Beck, R., Shasteen, W. J., Tarr, S. M., Cheang, M. C., Yoder, B. J., Budd, G. T., Nielsen, T. O., Hicks, D. G., Estopinal, N. C. and Ross, D. T. 2006. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* **24**:3039-3047.
69. Rossier, G., Meier, C., Bauch, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F. and Kuhn, L. C. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J bio chem.* **274**:34948-34954.
70. Sang, J., Lim, Y. P., Panzica, M., Finch, P. and Thompson, N. L. 1995. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer research.* **55**:1152-1159.
71. Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., Gartner, F. and Matos, A. J. 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC vet res.* **In press.**
72. Schmidt, A. F., Nielen, M., Klungel, O. H., Hoes, A.W., de Boer, A., Groenwold, R. H. and Kirpensteijn, J. 2013. Prognostic factors of early metastasis and mortality in dogs with appendicular osteosarcoma after receiving surgery: An individual patient data meta-analysis. *Pre vet med.* **In press.**
73. Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem.* **274**:19745-19751.
74. Shennan, D. B. 1994. Inhibition of system L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. *Onc Rep.* **20**:234-244.
75. Shennan, D. B., Thomson, J., Barber, M. C. and Travers, M. T. 2003. Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochimica et biophysica*

acta. **1611**:81-90.

76. Shennan, D. B., Thomson, J., Gow, I. F., Travers, M. T. and Barber, M. C. 2004. L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochimica et biophysica acta*. **1664**:206-216.

77. Shum, W. Y., Ding, H. J., Liang, J. A., Yen, K. Y., Chen, S. W. and Kao, C.H. 2012. Use of pretreatment metabolic tumor volumes on PET-CT to predict the survival of patients with squamous cell carcinoma of esophagus treated by curative surgery. *Anti res*. **32**:4163-4168.

78. Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W. and Nolte, I. 2006. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J vet int med*. **20**:1184-1190.

79. Smith, A. N. 2003. Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Vet cli Nor Ame Sma ani prac*. **33**:533-552.

80. Smrkovski, O. A., Essick, L., Rohrbach, B. W. and Legendre, A. M. 2013. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Vet com onc*. **In press**.

81. Sorenmo, K. U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A. M., Langeland, M., Mongil, C. M., Grondahl, A. M., Teige, J. and Goldschmidt, M. H. 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet com onc*. **7**:162-172.

82. Storey, B. T., Fugere, C., Lesieur-Brooks, A., Vaslet, C. and Thompson, N. L. 2005. Adenoviral modulation of the tumor-associated system L amino acid transporter, LAT1, alters amino acid transport, cell growth and 4F2/CD98 expression with cell-type specific effects in cultured hepatic cells. *Int J can*. **117**:387-397.

83. Timmerman, L. A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R. J., Padro, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D. A., Ethier, S. P., van 't Veer, L. J., Polyak, K., McCormick, F. and Gray, J. W. 2013. Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target. *Cancer cell*. **24**:450-465.
84. Travers, M. T., Gow, I. F., Barber, M. C., Thomson, J. and Shennan, D. B. 2004. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. **1661**:106-112.
85. Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W. and Endou, H. 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular pharmacology*. **61**:729-737.
86. Uramoto, H., Nakanishi, R., Nagashima, A., Uchiyama, A., Inoue, M., Osaki, T., Yoshimatsu, T., Sakata, H., Nakanishi, K. and Yasumoto, K. 2010. A randomized phase II trial of adjuvant chemotherapy with bi-weekly carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus gemcitabine in patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. **30**:4695-4699.
87. Verrey, F. 2003. System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch*. **445**:529-533.
88. von Euler, H., Einarsson, R., Olsson, U., Lagerstedt, A. S. and Eriksson, S. 2004. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J vet int med*. **18**:696-702.
89. Wachter, D. L., Fasching, P. A., Haeberle, L., Schulz-Wendtland, R., Dimmler, A., Koscheck, T., Renner, S. P., Lux, M. P., Beckmann, M. W., Hartmann, A., Rauh, C. and Schrauder, M. G. 2013. Prognostic molecular markers and neoadjuvant therapy response in anthracycline-treated breast cancer patients. *Archives of gynecology and obstetrics*. **287**:337-344.

90. Wiedemann, G., Mella, O., Roszinski, S., Weiss, C. and Wagner, T. 1992. Hyperthermia enhances mitoxantrone cytotoxicity on human breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice. *Inter J rad onc, biology, physics*. **24**:669-673.
91. Yamashita, A., Maruo, K., Suzuki, K., Shiota, K., Kobayashi, K. and Hioki, K. 2001. Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. *J vet med sci*. **63**:831-836.
92. Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S. H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J. Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. and Endou, H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica et biophysica acta*. **1514**:291-302.
93. Yanagisawa, N., Ichinoe, M., Mikami, T., Nakada, N., Hana, K., Koizumi, W., Endou, H. and Okayasu, I. 2012. High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J cli path*. **65**:1019-1023.
94. Yoon, J. H., Kim, Y. B., Kim, M. S., Park, J. C., Kook, J. K., Jung, H. M., Kim, S. G., Yoo, H., Ko, Y. M., Lee, S. H., Kim, B. Y., Chun, H. S., Kanai, Y., Endou, H. and Kim, D. K. 2004. Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer letters*. **205**:215-226.
95. Youland, R. S., Kitange, G. J., Peterson, T. E., Pafundi, D. H., Ramiscal, J. A., Pokorny, J. L., Giannini, C., Laack, N. N., Parney, I. F., Lowe, V. J., Brinkmann, D. H. and Sarkaria, J. N. 2013. The role of LAT1 in (18)F-DOPA uptake in malignant gliomas. *J neuro-oncology*. **111**:11-18.